

Université de Sherbrooke

Développement de nouveaux modèles cellulaires et animaux de cancer ovarien

Par

Sylvain L'Espérance

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès science (M.Sc.) en Microbiologie

29 avril 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-05931-1

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-05931-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

1. Résumé	1
2. Introduction	4
2.1. Statistiques canadiennes sur le cancer.	4
2.2. Anatomie et physiologie du système reproducteur féminin interne	4
2.3. Transformation néoplasique de la surface épithéliale de l’ovaire	8
2.3.1. Les oncogènes les plus fréquemment impliqués dans le cancer de l’ovaire	11
2.3.2. Les gènes supresseurs de tumeur impliqués dans le cancer ovarien	14
2.4. Histologie des cancers ovariens	17
2.4.1. Tumeur épithéliale de type séreux	19
2.4.2. Tumeur épithéliale de type mucineux	20
2.4.3. Tumeur épithéliale de type endométrioïde	21
2.4.4. Autre type de tumeur épithéliale ovarienne	22
2.5. Détection des cancers ovariens	23
2.5.1. Le marqueur CA125	23
2.6. Traitements des cancers ovariens	25
2.6.1. Cytochirurgie	25
2.6.2. Chimiothérapie	25
2.7. Propriétés et cascade métastatique des cellules cancéreuses	27
2.7.1. Acquisition d’un potentiel de réplication illimité	27
2.7.2. Prolifération incontrôlée	28
2.7.3. Angiogénèse	28
2.7.4. Capacité d’invasion et de métastase	29
2.7.5. Résistance à l’apoptose et à l’anoïkose	30
2.8. Modèles de cancer ovarien	31
2.8.1. Modèles cellulaires	31
2.8.2. Modèles cellulaires en trois dimensions	32
2.8.3. Modèles animaux	33
3. Objectifs du projet	34

4. Matériel et méthodes	35
4.1. Provenance et historique médicale des échantillons biologiques	35
4.1.1. Lignée OVC-116-A	35
4.1.2. Lignée COV-2	36
4.2. Culture cellulaire	37
4.3. Caractérisation morphologique des lignées cellulaires	40
4.3.1. Caractérisation phénotypique	40
4.3.2. Caractérisation par microscopie électronique à balayage	40
4.4. Expression de marqueurs cellulaires spécifiques	42
4.4.1. Marqueurs sécrétés	42
4.4.2. Analyse des marqueurs cellulaires par immunobuvardage de type Western	43
4.4.3. Analyse des marqueurs cellulaires par immunofluorescence indirecte sur lame	44
4.4.4. Analyses mutationnelles des lignées cellulaires	47
4.5. Paramètres de croissance	48
4.5.1. Courbe de croissance et évaluation du temps de génération	48
4.5.2. Évaluation de la clonogénécité	49
4.5.2.1. Clonogénécité en condition adhérente	49
4.5.2.2. Clonogénécité en condition non-adhérente	49
4.5.3. Croissance et viabilité en sphéroïde	50
4.5.3.1. Viabilité des sphéroïdes en utilisant la double coloration à l'Iodure de Propidium et à l'Orangé d'Acridine	50
4.5.3.2. Viabilité des sphéroïdes : technique de la croissance post-sphéroïde	51
4.5.3.3. Viabilité des sphéroïdes : technique de la visualisation de la mortalité intra-sphéroïde via une coloration à l'Iodure de Propidium	51
4.6. Évaluation moléculaire de la résistance à l'apoptose et à l'anoïkose	52
4.6.1 Evaluation par immunobuvardage de type Western de protéines impliquées dans l'apoptose	52
4.6.2 Évaluation de l'induction de l'anoïkose en sphéroïde par une méthode ELISA	53
4.7. Sensibilité aux agents chimiothérapeutiques	54
4.7.1. Essai XTT	54

4.8. Caryotype spectral	55
4.9. Essais de tumorigénèse <i>in vivo</i>	56
5. Résultats	58
5.1. Caractéristiques morphologiques des lignées cellulaires	58
5.2. Expression de marqueurs cellulaires spécifiques	61
5.3. Caractéristiques moléculaires et caryotypes des nouvelles lignées cellulaires	68
5.4. Paramètres de croissance des nouvelles lignées cellulaires	71
5.5. Croissance en sphéroïde	72
5.6. Résistance à l'apoptose et à l'anoïkose	74
5.7. Sensibilité aux agents chimiothérapeutiques	87
5.8. Essais de tumorigénèse <i>in vivo</i>	90
6. Discussion	95
7. Conclusions	106
8. Perspectives	107
9. Remerciements	109
10. Références	110

Liste des figures

Figure 1 : Le système reproducteur féminin	6
Figure 2 : Anatomie structurale de l’ovaire	8
Figure 3 : La surface épithéliale de l’ovaire	10
Figure 4 : Tumeur séropapillaire de la surface épithéliale de l’ovaire	19
Figure 5 : Tumeur épithéliale de type mucineux	20
Figure 6 : Tumeur épithéliale de type endométrioïde	21
Figure 7 : Tumeurs mullérienne malignes mixte de l’ovaire de type carcinosarcome homologue	22
Figure 8 : Morphologie microscopique de OVC-116-A et de COV-2	60
Figure 9 : Expression globale par immunobuvardage de type Western de différents marqueurs cellulaires dans des nouvelles lignées de cancer ovarien	64
Figure 10: Visualisation de différents marqueurs cellulaires par immunofluorescence indirecte sur lame	66
Figure 11: Visualisation du marqueur CA125 sur des sphéroïdes par immunofluorescence indirecte sur lame	67
Figure 12: Caryotype des nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien	70
Figure 13 : Courbe de croissance de OVC-116-A et de COV-2	71
Figure 14 : Viabilité des sphéroïdes OVC-116-A et COV-2 après deux jours d’incubation et 6 jours d’incubation	73
Figure 15 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 dans les lignées de cancer ovarien	75
Figure 16 : Capacité d’adhésion des cellules croissant en sphéroïdes en fonction du temps	76
Figure 17 : Visualisation de la mortalité cellulaire en sphéroïde par la méthode d’incorporation de l’Iodure de propidium	77
Figure 18 : Résistance à l’anoïkose des nouvelles lignées de cancer ovarien	78
Figure 19 : Induction de l’anoïkose dans des lignées cellulaires de cancer ovarien croissant en sphéroïde	79
Figure 20 : Disparition de la pro-caspase 9 relative à la GAPDH dans les sphéroïdes	80
Figure 21 : Disparition relative de la pro-caspase 3 dans les sphéroïdes	81

Figure 22 : Expression relative de PARP en sphéroïde	83
Figure 23 : Expression globale de Bcl-2 dans les sphéroïdes OVC-116-A et de COV-2 évaluée par immunobuvardage de type Western	84
Figure 24 : Expression relative de Bcl-X _L dans les sphéroïdes	85
Figure 25 : Expression relative de Bax dans les sphéroïdes	86
Figure 26 : Sensibilité des nouvelles lignées au Cisplatine	88
Figure 27 : Sensibilité des nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien au Taxol	89
Figure 28 : Sensibilité des nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien au TRAIL	90
Figure 29 : Injection intrapéritonéale de OVC-116-A	92
Figure 30 : Injection intrapéritonéale de COV-2	94

Listes des tableaux

Tableau 1 : Stades de développement des tumeurs ovariennes classifiées selon le système FIGO	18
Tableau 2 : Condition de culture des lignées cellulaires utilisées	39
Tableau 3 : Anticorps primaires utilisés	45
Tableau 4 : Anticorps secondaires utilisés	47
Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des lignées cellulaires de cancer ovarien	59
Tableau 6 : Propriétés de sécrétion d'antigènes tumoraux des lignées de cancer ovarien	61
Tableau 7 : Marqueurs cellulaires spécifiques exprimés par les lignées de cancer ovarien	63
Tableau 8 : Caractéristiques moléculaires et caryotypes des lignées cellulaires de cancer ovarien	69
Tableau 9 : Résumé des paramètres de croissance des nouvelles lignées de cancer ovarien	74
Tableau 10 : Sensibilité aux agents chimiothérapeutiques	87
Tableau 11 : Essais de tumorigénèse in vivo	91

Liste des abréviations

µg	microgramme
µl	microlitre
ADN	acide désoxyribonucléique
AEBSF	fluoride 4-(2-aminoéthyl)benzenesulphonyle
ATP	adénosine triphosphate
BSA	bovine serum albumine
Ca	calcium
CA15.3	MUC-1
CEA	Carcinoembryonic antigen
CK	cytokératine
CO ₂	Dioxyde de carbone
COV	Cancer ovarien
CPD	séchage par point critique
CTP	cystidine triphosphate
DMEM	Dulbelco's modified Eagle medium
DMSO	diméthylsulphoxyde
EDTA	acide (éthylènedinitrilo) tétraacétique
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EMA	Epithelial membrane antigen
FBS	Fetal Bovine Serum
FIGO	Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GAPDH	glycéraldéhyde-3 phosphate déhydrogénase
GTP	Guanosine Triphosphate
H&E	Hématoxyline et éosine
HAT	hystérectomie abdominale totale
HB-EGF	Heparin-Binding EGF
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KDa	kilodalton
LT	SV40 large T antigen
mA	milliampert
MESO	Mésothéliale
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
mM	millimolaire
MMMT	Malignant Mixed Mullerian Tumor
MMP	métalloprotéase de matrice
MUC-1	mucine 1
Na ₂ (P ₂ O ₇)	pyrophosphate de disodium

NaF	Fluorure de sodium
NK	Natural Killer
NP40	Nonidet P 40
OSE	ovarian surface epithelium
OVC	Ovaire cancéreux
OVN	Ovaire normal
PARP	poly(ADP-ribose) polymérase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluoride
POD	peroxydase
Poly-HEMA	poly-(2-hydroxyethylméthacrylate)
PVDF	fluorure de polyvinilidene
Rpm	revolution per minute
RPMI	Roswel Park Memorial Institute
SCID	severe combined immunodeficiency
SOB	salpingo-ovariectomie bilatérale
SOD	salpingo-ovariectomie droite
SSC	Saline Sodium Citrate
SSCP	single strand conformational polymorphisms
TGF α	Tumor Growth Factor-alpha
TGF β	Tumor Growth Factor-beta
TNF α	Tumor Necrosis factor-alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TTP	thymine triphosphate
TWEEN	polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
U	unité
V	volts
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	watt
WT	Wildtype
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

1. Résumé

Développement de nouveaux modèles cellulaires et animaux de cancer ovarien

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke par Sylvain
L'Espérance en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en
microbiologie**

En Amérique du Nord, le cancer de l'ovaire est parmi les cancers gynécologiques les plus mortels. Seulement au Canada, en 2004, on estime que le taux de mortalité causé par ce type de cancer est de 66%. Plusieurs équipes de recherche partout à travers le monde mettent beaucoup d'efforts afin de comprendre la physiopathologie de cette maladie. Cependant, un des obstacles majeurs à l'avancement des connaissances dans ce domaine est le nombre restreint de bons modèles cellulaires et animaux. Afin de pouvoir fournir de nouveaux modèles de cellules cancéreuses au monde de la recherche, deux nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien (OVC-116-A et COV-2) ont été établies et caractérisées. Celles-ci ont été caractérisées au niveau de leurs paramètres de croissance (courbe de croissance, clonogénécité, croissance en sphéroïde) et ces analyses ont montré que les deux modèles cellulaires se comportent de façon sensiblement similaire en culture. De plus, le statut de plusieurs marqueurs cellulaires tels les récepteurs de la famille EGFR, les cadhérines classiques ainsi que des récepteurs hormonaux a été évalué pour chaque lignée cellulaire. La tumorigénicité in vivo a aussi été étudiée par des injections sous-cutanées de cellules cancéreuses dans des souris SCID et des souris NUDE et par des injections intrapéritonéales dans des souris SCID. Les deux nouvelles lignées cellulaires croissent dans les animaux. De façon spécifique, la lignée OVC-116-A a montré une croissance très rapide in vivo (environ 14 jours sous-cutanés pour former

une tumeur de 1 centimètre de diamètre et 28 jours intrapéritonéal) alors que la lignée COV-2 a montré le phénotype contraire, soit une croissance lente in vivo lorsqu'injectée dans les animaux. D'autres analyses moléculaires comme des analyses de mutations des gènes TP53, BRCA1, BRCA2 et KRAS ainsi que des caryotypes ont été faits sur chacune des lignées. La lignée OVC-116-A présente une mutation dans l'exon 7 du gène TP53 et une mutation dans le codon 13 du gène de KRAS. Cette lignée cellulaire présente aussi un caryotype simple caractérisé principalement par une trisomie 10 et une translocation entre le chromosome 6 et le chromosome 15. La lignée cellulaire COV-2, quant à elle, montre aussi une mutation dans l'exon 8 du gène TP53 mais aucune mutation dans le gène KRAS. Le caryotype de cette lignée est de type complexe présentant plusieurs trisomies, des tétrasomies et des translocations multiples sur des chromosomes. Finalement, la sensibilité des nouvelles lignées cellulaires aux agents chimiothérapeutiques les plus utilisés durant traitement du cancer ovarien (Cisplatine et Taxol) a été évaluée. Suite à ces résultats, la lignée COV-2 semble être un bon modèle pour étudier la chimiorésistance car cette lignée semble être résistante à ces drogues. Des études de la viabilité en sphéroïde et à la résistance à l'anoïkose ont démontré que la lignée OVC-116-A est un bon modèle de résistance à l'anoïkose. Par des essais qualitatifs, il a été montré que lorsque cette lignée cellulaire croît en sphéroïde, elle ne montre que très peu de signes de mortalité cellulaire. De plus, par des essais semi-quantitatifs, il a été suggéré que OVC-116-A a la capacité de pouvoir proliférer lorsque celle-ci est maintenue en suspension. Aussi, par une technique quantitative comme un ELISA de type sandwich, il a été possible de montrer aucune induction de l'anoïkose que lorsque OVC-116-A croît en sphéroïde. Des immunobuvardages de type Western ont

confirmé ces résultats en observant que la pro-caspase 9 et la pro-caspase 3 n'étaient pas activées et que la protéine PARP, substrat de la caspase 3 n'était pas clivée. De plus, les résultats ont montré une surexpression de la protéine Bcl-2 dans les sphéroïdes OVC-116-A. Cette constatation a permis d'émettre l'hypothèse que la protéine Bcl-2 pourrait jouer un rôle déterminant dans la survie en suspension des cellules de cancer ovarien. Nos résultats suggèrent donc que les nouvelles lignées cellulaires OVC-116-A et COV-2 représentent de bons modèles cellulaires pour étudier la résistance à l'anoïkose des cellules de cancer ovarien et la résistances aux drogues chimiothérapeutiques.

MOTS CLÉS : cancer, ovaire, modèle, caractérisation, chimiothérapie, anoïkose

2. Introduction

2.1. Statistiques canadiennes sur le cancer de l'ovaire

Le cancer est une des maladies les plus répandue dans le monde. Au Canada, en 2004, il est estimé que 145 500 nouveaux cas de cancer ainsi que 68 300 décès reliés à cette maladie seront enregistrés dans la population (Société canadienne du Cancer, 2004). En 2004, le cancer du sein chez les femmes ainsi que le cancer de la prostate sont les cancers ayant la plus grande incidence (Société canadienne du Cancer, 2004). Cependant, ces cancers demeurent faiblement mortels lorsqu'on les compare à d'autres cancers comme ceux du pancréas ou de l'œsophage. Chez les femmes, un des cancers ayant un très haut taux de mortalité est le cancer ovarien. En 2004, il est estimé que 2 300 nouveaux cas de cancer de l'ovaire seront diagnostiqués et que 1 550 décès y seront attribués (Société canadienne du Cancer, 2004). Le cancer de l'ovaire est donc beaucoup plus mortel que le cancer du sein. Le ratio décès/cas pour ce cancer est estimé à 0,66 comparativement à 0,25 pour le cancer du sein. C'est donc dire que plus d'une femme sur deux qui seront diagnostiquées avec un cancer ovarien risque d'en mourir. Ces statistiques font du cancer ovarien, le cancer gynécologique le plus léthal.

2.2. Anatomie et physiologie du système reproducteur féminin interne

La figure 1 montre le système reproducteur féminin. Sommairement, ce système est caractérisé par trois composantes : l'utérus, les trompes de Fallope et les ovaires (figure 1-A). L'ensemble de ce système se retrouve dans la cavité intrapéritonéale, cavité

virtuelle délimitée par le pelvis, le diaphragme et le péritoine viscérale (figure 1-B). Spécifiquement, les ovaires sont des glandes gonades qui sont maintenues en position par une série de ligaments (mésovarium, ligament utéro-ovarien, ligament suspenseur) (TORTORA et al., 1993). De façon structurale, les ovaires comprennent sept parties distinctes (figure 2). La partie la plus externe se nomme surface épithéliale (figure 3-A). C'est une monocouche cellulaire simple représentant qu'un pour cent de l'ovaire total. Elle est composée de cellules aplaties, cuboïdales ou pseudostratifiées (figure 3-B). Lorsqu'analysée en microscopie électronique à balayage, ces cellules sont caractérisées par une forme en dôme et sont couvertes de microvillosités (figure 3-B). Cette surface épithéliale peut aussi être considérée comme une surface mésothéliale spécialisée car une hypothèse propose que celle-ci serait le prolongement de la surface mésothéliale du mésovarium (AUERSPERG et al., 2001). Cette surface épithéliale est impliquée dans le transport des nutriments retrouvées dans la cavité intrapéritonéale ainsi que dans le processus de rupture et réparation de la surface de l'ovaire lors de l'ovulation (AUERSPERG et al., 2001). L'épithélium (ou la surface épithéliale) de l'ovaire est responsable d'environ 90% de tous les cancers ovariens.

Sous-jacente à la surface épithéliale de l'ovaire se trouve la tunique albuginée. Cette capsule est composée de tissu conjonctif dense et irrégulier donnant la couleur blanchâtre à l'ovaire. Sous cette capsule, on retrouve le stroma. Le stroma est aussi une région de tissu conjonctif qui est plus dense vers l'extérieur (partie appelée cortex) et un peu plus relâchée vers l'intérieur (partie appelée médulla). C'est dans la médulla que se retrouvent les follicules ovariens. Lors du processus de maturation des ovules, les follicules ovariens

primaires contenant des ovocytes (ovules immatures) mûrissent pour devenir des follicules secondaires et finir en follicule de De Graaf. Ce processus de maturation est régulé par la sécrétion de FSH (hormone folliculo-stimulante) par l'adénohypophyse. Ce type de follicule est volumineux et contient toujours un ovocyte immature. Lorsque l'ovocyte devient mature, le follicule de De Graaf se rompt et expulse l'ovule à l'extérieur de l'ovaire. Après l'expulsion de l'ovule, le corps hémorragique (follicule rompu) évolue et devient un corps jaune. C'est cette structure qui synthétise des hormones comme la progestérone, l'œstrogène, la relaxine et l'inhibine (TORTORA et al., 1993).

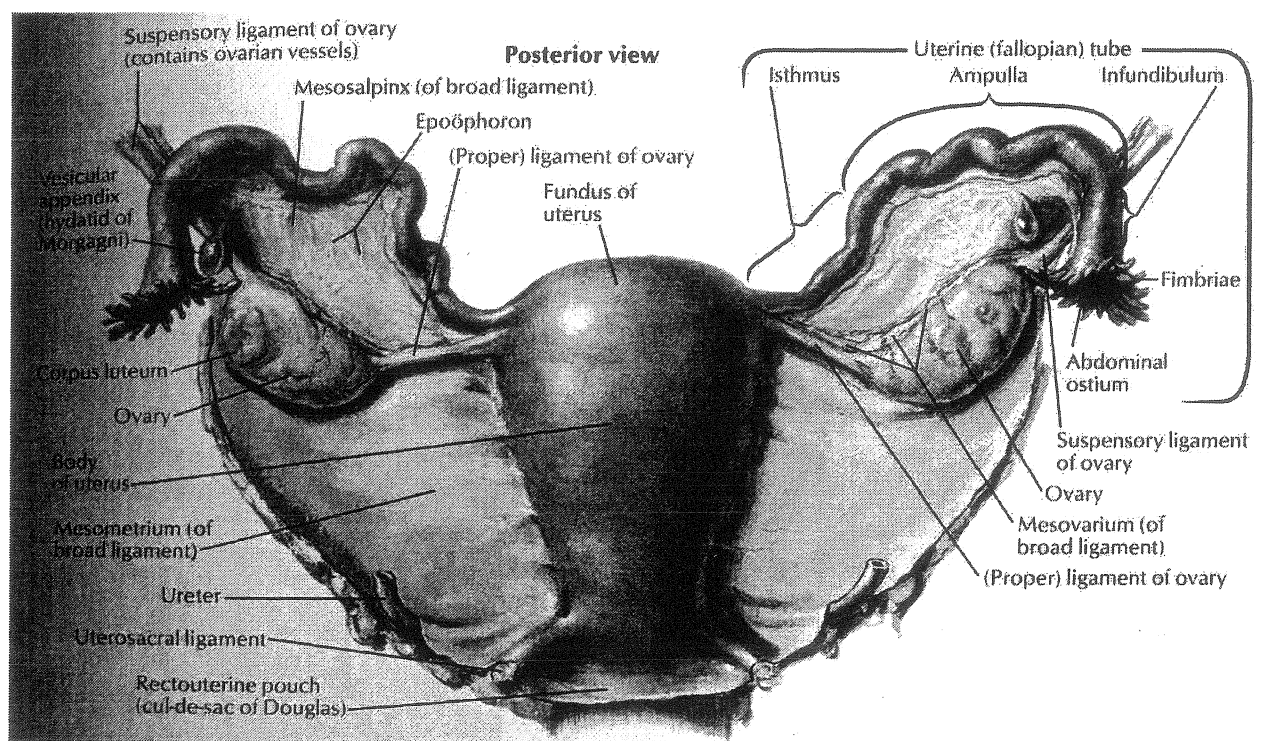


Figure 1-A : Vue postérieure du système reproducteur féminin

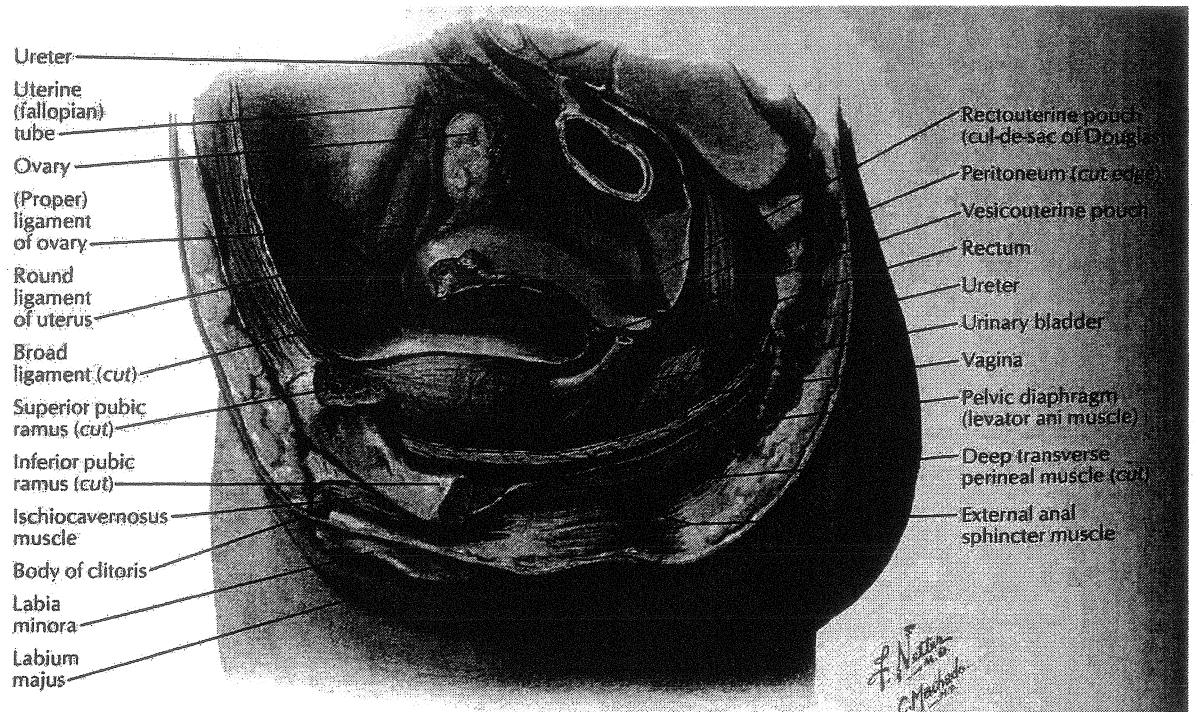


Figure 1-B : Coupe paramédiane (coupe sagittale) de la zone pelvienne de la femme

Figure 1 : Le système reproducteur féminin. 1-A) Vue postérieure du système reproducteur féminin montrant les différentes parties internes du système reproducteur. 1-B) Coupe paramédiane (coupe sagittale) de la zone pelvienne de la femme représentant le système reproducteur de la femme à l'intérieur de la cavité intrapéritonéale du pelvis. Figure tirée du livre *Atlas of human anatomy* de F. Netter, 1997.

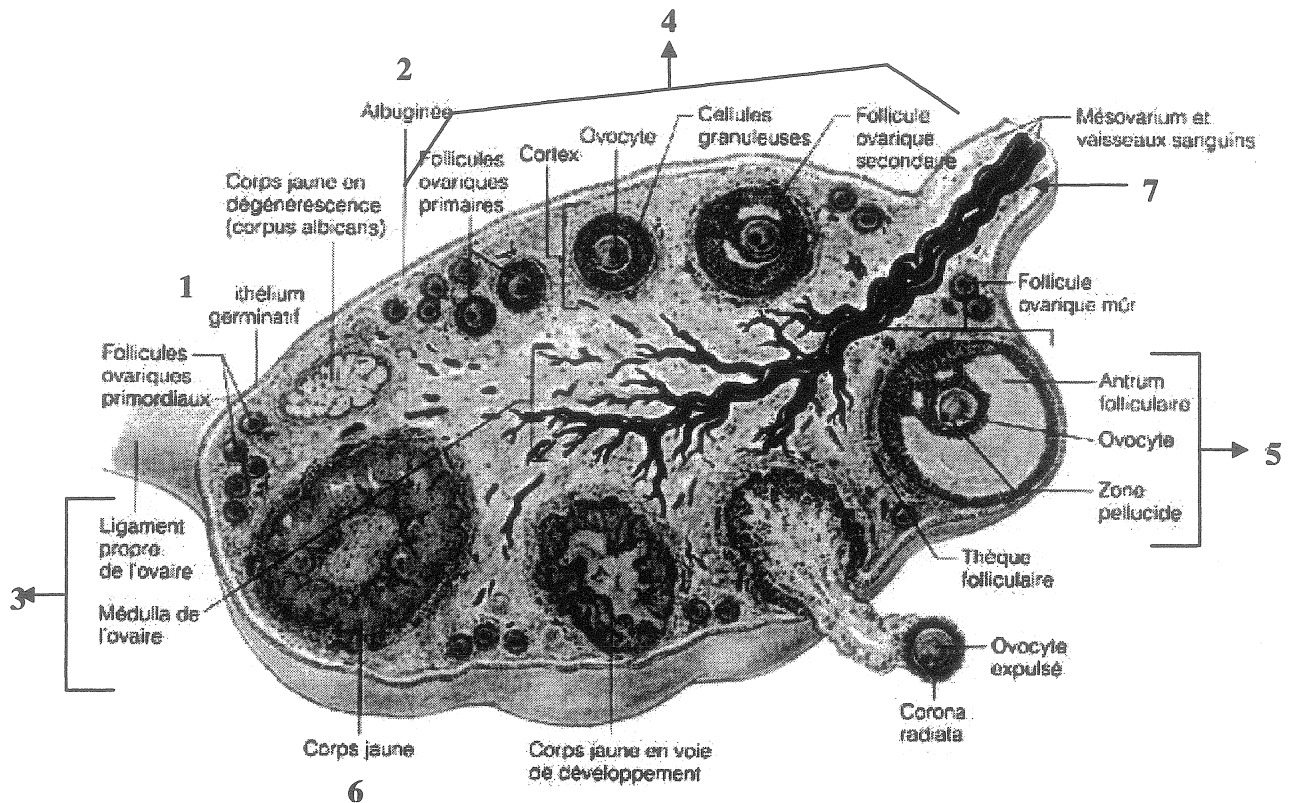


Figure 2 : Anatomie structurale de l'ovaire. L'anatomie structurale de l'ovaire comprend sept structures principales : 1) la surface épithéliale (surface germinative), 2) la tunique albuginée, 3) le stroma, 4) les follicules ovariens, 5) le follicule De Graaf, 6) le corps jaune et 7) l'hile de l'ovaire. Figure tirée du livre *Atlas of human anatomy* de F. Netter, 1997

2.3. Transformation néoplasique de la surface épithéliale de l'ovaire

Quatre-vingt-dix pour cent des cancers ovariens sont d'origine épithéliale (AUERSPERG et al., 2001). La plupart surviennent de façon spontanée et seulement 5 à 10% des cas sont des cancers héréditaires (AUERSPERG et al., 2001). À ce jour, les stades précoces du développement du cancer de l'ovaire restent encore mal compris, malgré que l'on sait que la progression néoplasique de la surface épithéliale de l'ovaire est un processus

multifactoriel (MURDOCK et al., 2002). Des facteurs comme l'âge (surtout les femmes âgées de 40 à 80 ans), des menstruations précoces, un début de ménopause tardif, la prise de médicaments stimulant la fertilité et les antécédents familiaux de cancers ovariens, de cancers du sein ou du colon sont des facteurs prédisposant au développement du cancer ovarien (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER, SITE WEB). Bien que beaucoup de choses restent à savoir sur la transformation néoplasique de la surface épithéliale de l'ovaire, il semble que ces changements débutent lors de l'ovulation. Selon Fathalla, une ovulation incessante serait la cause de plusieurs désordres génomiques (génétiques ou chromosomiques) qui mèneraient au développement du cancer ovarien (FATHALLA, 1971). Lors de l'ovulation, la surface épithéliale de l'ovaire doit se briser pour éjecter l'ovule et doit rapidement se réparer par la suite. La prolifération rapide des cellules de la surface épithéliale favoriserait l'acquisition de plusieurs mutations dans le génome qui mèneraient à la transformation néoplasique et par la suite, au développement d'un cancer. Les erreurs les plus fréquemment retrouvées lors de la carcinogénèse de la surface épithéliale ovarienne sont des erreurs au niveau du nombre de chromosome présents dans la cellule (HOGLUND et al., 2003).

A

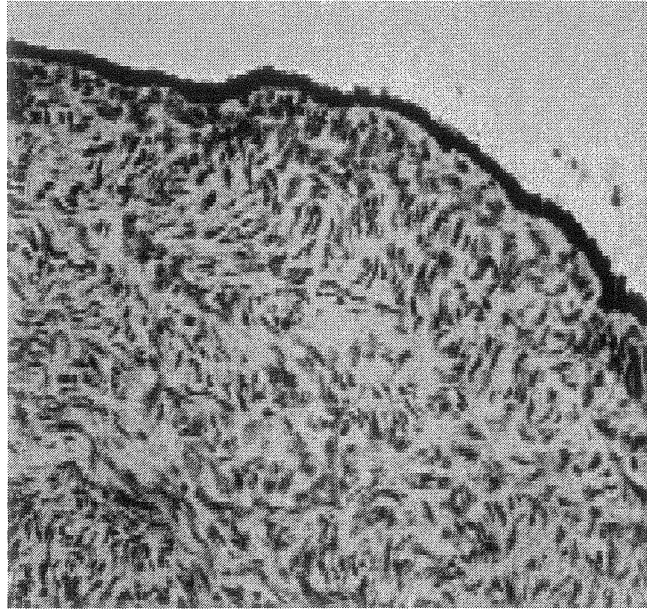
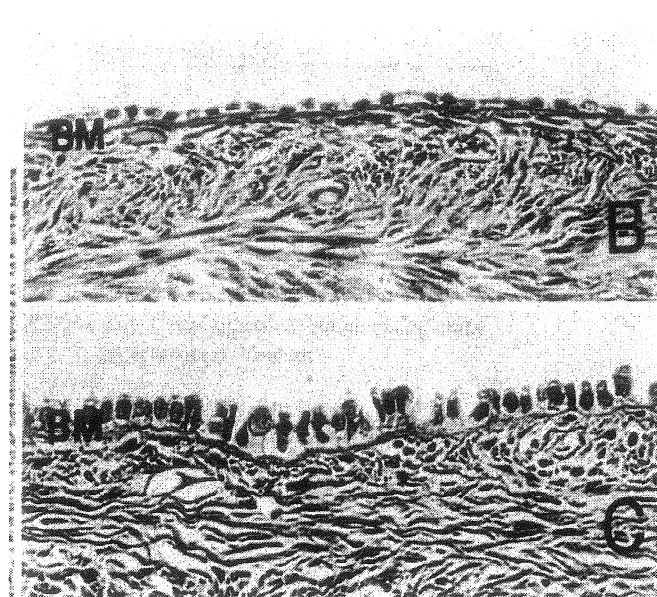


Figure 3-A : Surface épithéliale de l'ovaire. Figure tirée du livre *Ovarian Cancer* de F.R. Ozols



D

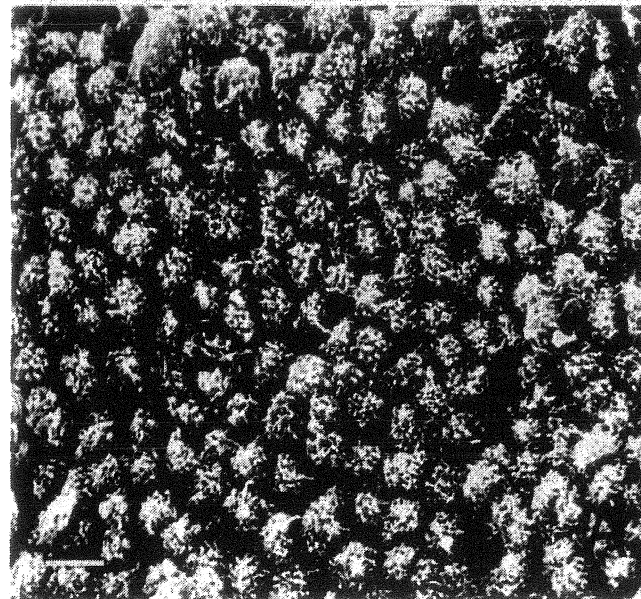


Figure 3-B, C et D : Structure morphologique de la surface épithéliale de l'ovaire. Figures tirées de OKAMURA et KATABICHI, 2003

Figure 3 : La surface épithéliale de l'ovaire. A : la surface épithéliale de l'ovaire est une monocouche cellulaire simple constituant seulement que 1% de la superficie totale de l'ovaire. B et C : Microscopie électronique des cellules de la surface épithéliale de l'ovaire montrant la morphologie de ces cellules. D : Microvillosités retrouvées à la surface épithéliale de l'ovaire

La plupart des carcinomes ovariens ont des aberrations chromosomiques complexes allant de chromosomes uniques jusqu'à la présence de trisomies et de tétrasomies (HOGLUND et al., 2003). Les changements les plus souvent retrouvées au niveau du nombre de chromosome de cellules cancéreuses ovariennes sont des pertes au niveau des chromosomes 4, 8, 11, 12, 14, 15, 17 et 22 ainsi que des gains au niveau des chromosomes 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12 et 20 (HOGLUND et al., 2003). Les gains et les pertes au niveau des chromosomes ainsi que la présence de mutations dans des gènes permettent l'activation de certains oncogènes (gènes impliqués dans la transformation des cellules en culture ou impliqués dans la formation des cancers (LODISH et al., 1999)) et l'inactivation de certains gènes suppresseurs. L'activation d'oncogènes tels que Ki-RAS, AKT-2, PI3KCA, EGFR et ErbB2 seraient impliqués dans la transformations néoplasique de l'épithélium ovarien (OZOLS, 2003).

2.3.1. Les oncogènes les plus fréquemment impliqués dans le cancer ovarien

L'oncogène Ki-RAS encode pour une petite protéine pouvant lier les GTPs. Cette protéine a normalement un rôle dans la signalisation intracellulaire en interagissant avec les récepteurs de type tyrosine-kinase. Plusieurs études ont rapporté des mutations dans le proto-oncogène (forme normale d'un gène pouvant causer des cancers lorsque muté (LODISH et al., 1999)) Ki-RAS dans plusieurs cas de tumeurs mucineuses (voir section 2.4.2) ou de tumeurs à faible potentiel de malignité (OZOLS, 2003; CUATRECASAS et al, 1998; GUERRERO et al, 2000; HOGDALL et al., 2003). Dans la plupart des ces tumeurs, une mutation dans les codons 12 et 13 du gène amène une activation constitutive de la protéine (GUERRERO et al, 2000). Plusieurs évidences suggèrent que le potentiel

malin des cellules tumorales pourrait être influencé par la nature moléculaire de la mutation dans ce gène (GUERRERO et al, 2000). Une mutation dans le codon 13 du gène de Ki-RAS semble diminuer le potentiel de transformation des cellules de cancer dans des systèmes expérimentaux *in vitro* et *in vivo* (GUERRERO et al, 2000). De plus, une mutation dans le codon 13 de ce gène semble être exclusivement présent dans les tumeurs qui ne montrent aucune invasion locale et n'est jamais présente dans les lésions métastatiques suggérant l'importance de cette protéine dans les stades précoces de la maladie ou dans le développement de la tumeur (GUERRERO et al., 2000). Cependant, une mutation dans le codon 12 du gène semble être un événement plus fréquent et confère un phénotype tumoral beaucoup plus agressif. Ce phénotype n'est pas observable au niveau de la morphologie cellulaire et de la prolifération cellulaire mais l'agressivité des tumeurs ayant une mutation dans ce codon s'observe au niveau de leur capacité réduite à induire l'apoptose (GUERRERO et al., 2000). L'importance de Ki-RAS dans la transformation néoplasique de la surface épithéliale de l'ovaire a aussi été démontrée dans une étude où des cellules normales de la surface épithéliale de l'ovaire immortalisée. L'insertion de Ki-RAS dans ces cellules a permis une croissance tumorale lorsqu'injectées dans des souris ainsi que l'expression de certains marqueurs cellulaires spécifiques au cancer ovarien tels que CA125 (Liu et al., 2004).

Les récepteurs de la famille du EGFR sont une famille de quatre récepteurs tyrosine-kinase (EGFR (erbB1), erbB2 (Her2), erbB3 (Her3) et erbB4 (Her4)) de type 1 qui interagissent de multiple façons dépendamment du type cellulaire (AUERSPERG et al., 2001). Ces récepteurs lient une panoplie de ligands solubles retrouvés dans le microenvironnement cellulaire. EGFR lie des ligands comme l'EGF, l'amphiréguline et

le TGF α . Des ligands comme HB-EGF, la β -celluline et l'épiréguline peuvent être liés par EGFR mais aussi par le récepteur Her4. Ce dernier, ainsi que Her3, peuvent lier l'héréguline comme ligand. Aucune molécule a été, jusqu'à maintenant, associée au récepteur erbB2 (WITTON et REEVES, 2003) cependant, certaines études récentes ont montrées que MUC4, une mucine membranaire retrouvée à la surface des cellules cancéreuses, semble se lier de façon intramembranaire au récepteur erbB2 et induit une phosphorylation spécifique du récepteur (CARRAWAY et al., 2002). Lorsque ces récepteurs lient leur ligand, ils peuvent homodimériser ou hétérodimériser avec un autre récepteur de la famille du EGFR. Cette dimérisation active les récepteurs et permet donc d'activer plusieurs voies de signalisation reliées à la survie cellulaire ou à la réponse aux mitogènes. L'épithélium ovarien normal exprime EGFR et très peu ou pas de erbB2. Cependant, lorsque le tissu se transforme et devient cancéreux, le récepteur erbB2 est amplifié ou surexprimé (CAMPIGLIO et ALLI, 1999). Des études ont montrées que l'amplification ou la surexpression de erbB2 survient dans 25% à 70% des cancers ovariens (AUERSPERG et al., 2001; WITTON et REEVES, 2003). De plus, il semble que la surexpression de ce récepteur soit associée à un mauvais pronostic (AUERSPERG et al., 2001). Étant donné que ces récepteurs semblent avoir une certaine implication dans la tumorigénèse et dans la progression des cellules cancéreuses, des thérapies ciblant EGFR (via le Cetuximab) (PREWETT et al., 1996) et erbB2 (via l'Herceptin) (Mc NEIL et al., 1998) ont vu le jour. Cependant ces traitements ne sont pas appliqués lors du traitement du cancer ovarien.

2.3.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cancer ovarien

Parmi les effets engendrés par la perte d'hétérozygocité des chromosomes, se trouvent l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Un gène suppresseur de tumeur est un gène qui encode une protéine empêchant la progression tumorale (LODISH et al., 1999). Parmi tous les chromosomes où on dénote une perte d'hétérozygocité, les chromosomes 3 et 17 sont sans aucun doute ceux où les effets sont les plus marqués. Sur le chromosome 17 se trouve plusieurs gènes qui sont associés au cancer ovarien. Sur ce chromosome, des gènes comme TP53 et BRCA1 semblent avoir une importance plus prononcée quant à leur action au niveau des cellules et sont les plus caractérisés. Outre ces gènes sur le chromosome 17, d'autres gènes tels celui des cadhérines semblent aussi être impliqués dans la tumorigénèse ovarienne (AUERSPERG et al., 2001). L'implication de cette famille de protéines est moins caractérisée mais des études sont en cours dans plusieurs groupes de recherche afin d'en découvrir leur rôle dans la transformation et la progression tumorale. D'autres études ont montré qu'un transfert du chromosome 3 dans des cellules ayant une perte d'hétérozygocité du chromosome 3p renverse le phénotype transformé des cellules (OZOLS, 2003)

La protéine p53 est une protéine qui contient un domaine d'activation transcriptionnelle ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN. Dans la cellule normale, p53 joue plusieurs rôles. On qualifie cette protéine comme « le gardien du génome ». La surexpression de cette protéine induit deux effets principaux : l'arrêt du cycle cellulaire ou l'induction de l'apoptose (KO et PRIVES, 1996). Les cellules normales qui

n'expriment plus de p53 sont plus instables génétiquement et sont plus sujettes à devenir cancéreuses. La mutation de p53 est un événement fréquent dans les cancers ovariens et dans les cancers en générales. Approximativement 50% des cancers ovariens de haut grade montrent des altérations génétiques dans le gène TP53 (JAZAERI et al., 2002). Cependant, dans les stades précoces (stade 1 et 2) de la maladie, la prévalence des mutations dans le gène TP53 n'est que d'environ 1% (KMET et al., 2003) ce qui laisse supposer que les mutations dans ce gène ne semblent pas être importantes pour le développement précoce de la tumeur.

Les gènes de susceptibilité au cancer du sein et au cancer ovarien, BRCA1 et BRCA2, sont mutés seulement dans les cas de cancers héréditaires. BRCA1 a été le premier des deux gènes à être découvert. Il est localisé sur le chromosome 17 à la position q21 (OZOLS, 2003). À l'état sauvage, ce gène code pour une protéine nucléaire de 220 kDa qui est impliquée dans le développement embryonnaire, dans la réparation de l'ADN (JAZAERI et al, 2002) et dans la transcription des gènes (NADEAU et al., 2000). Il a été démontré récemment que, comme dans le cas de la population juive Askenazi, la population canadienne française porte 8 mutations spécifiques dans les gènes de BRCA1 et BRCA2 qui se répètent de famille en famille (TONIN et al., 1998; TONIN et al., 2001). Des études récentes montrent que même dans des cas de cancers ovariens sporadiques, BRCA1 est défectif dû à l'hyperméthylation de son promoteur (McCOY et al., 2003). Une mutation dans un des gènes BRCA1 et BRCA2 n'explique cependant que quarante pourcent des cas de cancer ovarien d'origine familial. Certains de ces cancers ne comportent pas de mutation dans ces gènes. Plusieurs groupes recherchent donc un autre

gène de susceptibilité au cancer ovarien et au cancer du sein., BRCA3, un gène candidat a été identifié sur le chromosome 13q21 (THOMPSON et al., 2002). Par contre, aucun lien n'a jusqu'à ce jour été mis en évidence entre des mutations dans ce locus et l'incidence des cancers ovariens et des cancers du sein (THOMPSON et al., 2002).

Les cadhérines sont une famille de protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire calcium-dépendante. L'adhésion cellulaire médiée par les cadhérines est accomplie par des interactions protéiques homophiliques des domaines extracellulaires de ces protéines (CAVALLARO et al., 2002). La N-cadhérine, majoritairement exprimée dans les tissus nerveux et les tissus mésodermes, semble être responsable de l'adhésion entre les différents types cellulaires. Elle induit aussi la différenciation des tissus (WONG et al., 1999). Il a été proposé que l'expression de la N-cadhérine ainsi que de la E-cadhérine caractérise la différenciation épithéliale des cellules d'origine mésodermale (WONG et al., 1999). La N-cadherine est exprimée à la surface épithéliale ovarienne et son expression est conservée lors de la transformation néoplasique de cette surface (AUERSPERG et al., 2001). La E-cadhérine, qui est normalement exprimée dans les tissus épithéliaux, est limitée à de rares régions ovarienne où les cellules épithéliales adoptent une forme cuboïde (AUERSPERG et al., 2001). L'expression de cette protéine augmente considérablement dans des lésions métaplasiques et dysplasiques ou dans des carcinomes ovariens. Par contre, son expression est diminuée dans les carcinomes invasifs et dans les carcinomes provenant de l'ascite (WONG et al., 1999). Cette protéine semble avoir une fonction de suppresseur de l'invasion (WONG et al., 1999). La P-cadhérine se retrouve dans les épithéliums

squameux, pseudo-stratifiées et les épithéliums de transition. Elle n'est cependant pas exprimée dans les épithéliums simples et par conséquent, absente dans l'épithélium ovarien. Son expression dans les tissus carcinomateux l'ovaire semble varier d'un spécimen à l'autre. L'expression de la P-cadhérine diminue lors de la progression néoplasique des carcinomes de l'épithélium gastrique et semble augmenter dans les carcinomes pulmonaires (WONG et al., 1999). Cependant, contrairement à la E-cadhérine, la P-cadhérine n'agit pas en tant que suppresseur de l'invasion. Dans la progression néoplasique de la surface épithéliale ovarienne, la P-cadherine semble être présente dans certaine tumeur ovarienne (AUERSPERG et al., 2001).

2.4. Histologie des cancers ovariens

Différents types histologiques sont associés aux cancers épithéliaux ovariens. Pour chaque type histologique, est associé un grade et un stade de la tumeur. Le grade de la tumeur réfère au degré de ressemblance avec des cellules normales et au degré d'agressivité en terme de comportement cellulaire (SOCIETE CANADIENNE DU CANCER). Le stade de la tumeur réfère, quant à lui, à la taille de la tumeur et à son degré de propagation dans l'organisme (SOCIETE CANADIENNE DU CANCER). La classification histologique permet donc de regrouper les tumeurs cancéreuses selon leur apparence et leur comportement. Pour chaque type histologique, on associe aussi un degré de différenciation. Plus la tumeur est bien différenciée (plus les cellules cancéreuses ressemblent et se comportent comme les cellules normales), moins la tumeur est agressive (SOCIETE CANADIENNE DU CANCER). Le degré de différenciation est

souvent associé au grade de la tumeur. Plus le grade de la tumeur est élevé, moins la tumeur est différenciée et par conséquent, plus la tumeur est agressive. Le tableau 1 montre cette classification en vigueur.

Tableau 1

Stades de développement des tumeurs ovariennes classifiées selon le système FIGO

Stades	Description
1	Croissance limitée à un ovaire
1A	Croissance limitée aux ovaires, sans ascite. Aucune tumeur sur la surface externe de l'ovaire. Capsule intacte
1B	Croissance limitée sur les deux ovaires, sans ascite. Aucune tumeur sur la surface externe de l'ovaire. Capsule intacte
1C	Tumeur de stade 1A ou 1B mais avec des tumeurs sur la surface d'un ou des deux ovaires ou présentant une capsule rompue
2	Croissance tumorale impliquant un ou les deux ovaires avec la présence d'extensions pelviennes
2A	Extensions et/ou métastases sur l'utérus ou les trompes de Fallope
2B	Extensions et/ou métastases sur d'autres tissus pelviens
2C	Tumeur de stade 1A ou 1B mais avec des tumeurs sur la surface d'un ou des deux ovaires ou présentant une capsule rompue ou la présence d'ascite contenant des cellules cancéreuses
3	Tumeurs impliquant un ou deux ovaires et/ou présence de nodules rétropéritonéales ou inguinales
3A	Croissance tumorale impliquant des implants confinés à la région pelvienne
3B	Présence d'implants abdonimaux
3C	Présence d'implants abdonimaux plus grand que 2 cm de diamètre
4	Croissance tumorale impliquant un ou deux ovaires avec présence de métastases à distance

Tableau adapté de la Société canadienne de cancer, 2004

2.4.1. Tumeur épithéliale de type séreux

Les tumeurs de type séreux (figure 4) correspondent à 25% de tous les types de tumeur cancéreuse ovarienne. Ce sont des tumeurs qui se retrouvent, dans 50% des cas, de façon bilatérale (sur les deux ovaires). Le type histologique de ces tumeurs cancéreuses est appelé séreux car il montre une ressemblance histologique avec les cellules épithéliales des trompes de Fallope. Approximativement 30% des tumeurs séreuses sont des adénocarcinomes. De façon grossière, ce type d'adénocarcinome présente des phénotypes de malignité tels que plusieurs atypies nucléaires, un nombre de mitose augmenté, une augmentation de la densité cellulaire et de l'invasion stromale (OZOLS, 2003). Ils peuvent aussi se retrouver sous forme solide, cystique ou sous forme papillaire. L'analyse immunohistochimique des adénocarcinomes séreux montre que ce type de tumeur est positif pour l'expression du marqueur CA125 et négatif pour l'expression de ACE (antigène carcinoembryonique).

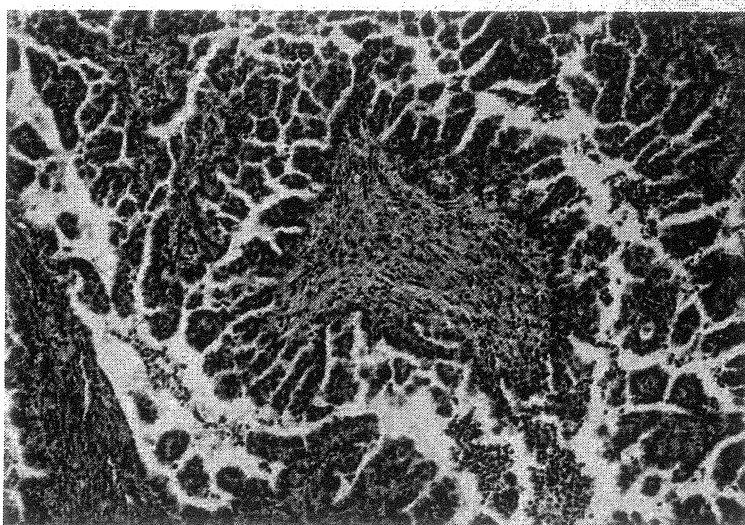


Figure 4 : Tumeur séropapillaire de la surface épithéliale de l'ovaire. Coloration H & E, Coloration bleue : cellule épithéliale cancéreuse, coloration mauve : cellules stromales. Figure tirée de OZOLS, 2003

2.4.2. Tumeur épithéliale de type mucineux

Les tumeurs mucineuses (figure 5) sont le deuxième type histologique le plus fréquent dans les néoplasmes ovariens. Ce type de tumeur montre une différenciation cellulaire s'apparentant aux cellules endocervicales ou gastrointestinales (OZOLS, 2003). La plupart des tumeurs mucineuses présentent les deux types de différenciation histologique. Approximativement 15% de toutes les tumeurs mucineuses sont des adénocarcinomes. Comme pour les adénocarcinomes séreux, ceux-ci présentent des atypies cellulaires sévères, un nombre augmenté de mitoses, des stratifications nucléaires ainsi que de l'invasion stromale. Ce type de tumeur est positif pour des marqueurs comme ACE (antigène carcinoembryonique) et AME (antigène de membranaire épithéliale) mais négatif pour le CA125 (OZOLS, 2003).

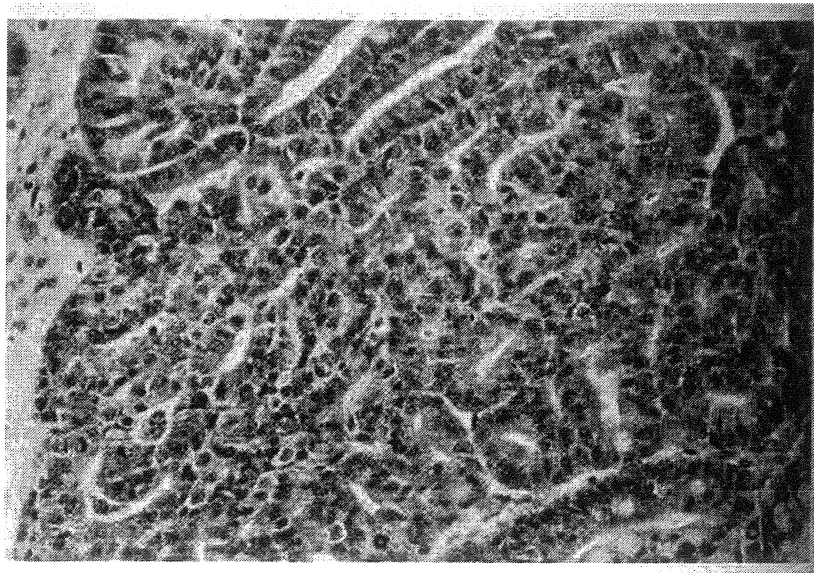


Figure 5 : Tumeur épithéliale de type mucineux. Coloration H&E montrant une tumeur mucineuse (coloration bleue) envahissant le tissu stromal (coloration rose). Figure tirée de OZOLS, 2003

2.4.3. Tumeur épithéliale de type endométrioïde

Les tumeurs épithéliales de type endométrioïde (figure 6) sont le type de tumeurs que l'on ne retrouve que dans environ 5% des tumeurs épithéliales ovariennes. Quoique peu fréquent, 10 à 20% de ces tumeurs sont des adénocarcinomes. La plupart sont bien différenciées et ressemblent grandement à des tumeurs de bas grade. Les tumeurs endométrioïdes considérées comme malignes montrent souvent un épithélium cuboïde stratifié d'une manière atypique ainsi que de l'invasion stromale (OZOLS, 2003). Les lésions endométrioïdes ressemblent grandement aux tumeurs des cellules de Sertoli. Cependant, contrairement à ce type de tumeurs, les lésions endométrioïdes sont positives pour des marqueurs tels que les récepteurs d'œstrogène et de progestérone, l'antigène AME ainsi que la présence de kératine. Elles sont négatives pour la production d'inhibine (OZOLS, 2003).

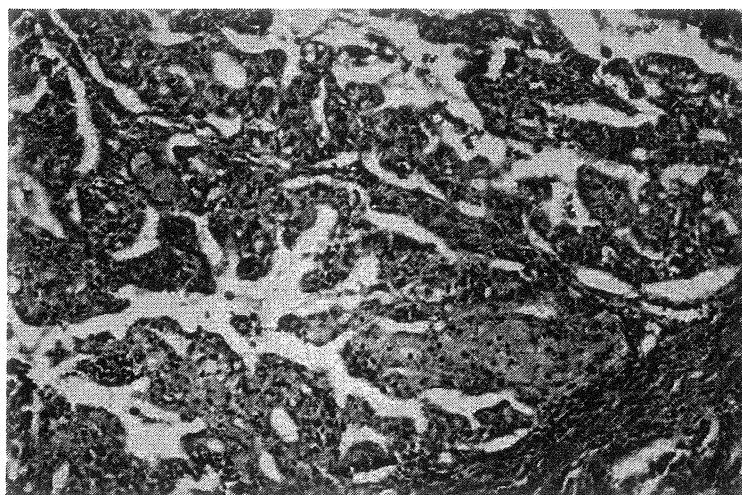


Figure 6 : Tumeur épithéliale de type endométrioïde. Coloration H&E montrant des cellules glandulaires de forme irrégulière infiltrant le stroma. Figure tirée de OZOLS, 2003

2.4.4. Autre type de tumeurs épithéliales ovariennes

Parmi les autres types de tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire, il y a les tumeurs mullériennes malignes mixtes (figure 7). Ce type de tumeur est très rare et représente moins de 1% de tous les cas de cancers ovariens. Ces tumeurs sont généralement composées de deux types de composantes : une composante stromale maligne et une composante épithéliale maligne. Lorsque la tumeur comprend que ces deux types histologiques, on qualifie la tumeur d'homologue. Cependant, si la tumeur comprend aussi d'autres composantes supplémentaires comme des composantes cartilagineuses, musculaires ou adipeuses, on qualifie donc la tumeur d'hétérologue. Ce rare type tumoral survient généralement chez la femme post-ménopausée et correspond généralement à un mauvais pronostic (OZOLS, 2003).

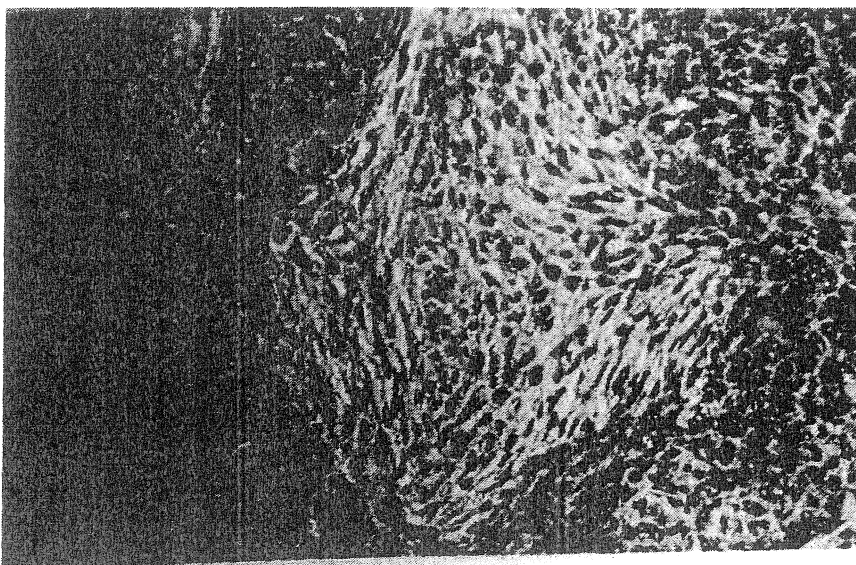


Figure 7 : Tumeurs mullérienne malignes mixte de l'ovaire de type carcinosarcome homologue. Coloration H&E, Figure tirée de OZOLS, 2003

2.5. Détection des cancers ovariens

Les cancers ovariens sont très difficiles à diagnostiquer car les symptômes, lorsque présent, ne sont pas spécifiques. Il semble que certaines patientes ayant des tumeurs ovariennes de bas grade peuvent ressentir des pressions pelviennes menant à une sensation d'inconfort abdominal. Cet inconfort amène souvent une pression au niveau de la vessie causant des problèmes urinaires tels que des changements dans la fréquence et l'urgence des urines (OZOLS, 2003). Au fur et à mesure que la maladie progresse, la patiente peut présenter d'autres symptômes tels qu'une augmentation lente de la taille nécessitant souvent un changement au niveau de la taille des vêtements causé principalement par l'accumulation d'ascite par la cavité intrapéritonéale, une satiété précoce et plusieurs autres problèmes physiologiques causés par l'accumulation de tumeurs secondaires sur différents organes (OZOLS, 2003). Malgré le fait que la plupart des patientes ressentent ces symptômes, moins de 50% d'entre-elles consulteront leur médecin et ce, souvent trop tard pour que la maladie puisse être détectée et prise en charge de façon précoce.

2.5.1. Le marqueur CA125

La glycoprotéine CA125 est le premier antigène décrit dans les études sur le cancer ovarien (WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Il a été démontré que le niveau sérique de cette protéine est élevé dans plus de 80% des cas de ce type de cancer. Cette protéine est riche en hydrates de carbone et contient plusieurs résidus sérine, proline et thréonine.

Peu de fonctions sont connues pour être associées à la protéine CA125. Cependant, certaines évidences tendent à montrer que celle-ci pourrait être associée à l'invasion (GAETJE et al., 1999) et à l'adhésion (GAETJE et al., 2002). De plus, de récentes études tendent à montrer que dans des cellules OVCAR-3 dont la protéine CA125 est séquestrée par l'ajout d'un ScFv (mini anticorps monoclonal spécifique à CA125), la prolifération, l'adhésion, l'invasion ainsi que la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques sont augmentées (BEAUDIN et al., 2005). Aussi, lorsqu'injectées de façon sous-cutanée, les cellules ne présentant plus de CA125 ne sont pas lysées par les cellules NK (BEAUDIN et al., 2005). L'expression de cette protéine semble aussi être influencée par plusieurs facteurs externes comme l'interféron- γ , le TNF- α , le TGF- α , le TGF- β (MARTH et al., 1998; MARTH et al., 1989) et l'EGF (KONISHI et al., 1994). En diagnostic clinique, CA125 est utilisé pour le suivi des patientes atteintes de cancer ovarien et la réponse à la chimiothérapie. Grâce à deux épitopes antigéniques, M11 et OC125, il a été possible d'évaluer les niveaux sériques de CA125, la normale étant fixée à 35 U/ml (WHITEHOUSE et SOLOMON, 2003). Il a été d'ailleurs établi que l'augmentation ou la diminution du taux sanguin de CA125 corrèle avec la progression ou la régression de la maladie (BAST et al, 1983).

2.6. Traitement des cancers ovariens

2.6.1. Cytochirurgie

Étant donné que la plupart des patientes ayant un cancer ovarien sont diagnostiquées à des stades avancés de la maladie, une des premières actions posées par les spécialistes lors de la prise en charge de la maladie est d'effectuer une chirurgie cytoréductive. Cette intervention chirurgicale a pour but d'enlever le maximum de masses cancéreuses à l'intérieur de la patiente. Cette opération est souvent accompagnée d'une opération de type HAT-SOB (hystérectomie abdominale totale-salpingo-ovariectomie bilatérale). Malgré cette intervention, il est impossible d'assurer que toutes les cellules cancéreuses ont été enlevées. C'est pourquoi, suite à la cytochirurgie, des traitements de chimiothérapie sont entrepris (OZOLS, 2003).

2.6.2. Chimiothérapie

Les drogues de première ligne sont à base de platine (Cisplatine ou Carboplatine). Des combinaisons de drogues sont, en générale, plus efficaces pour traiter ce type de cancer et consiste en un composé de la famille des platiniens (principalement du carboplatine) ainsi que du Taxol (OZOLS et al, 2003). Les composés de la famille des platiniens sont des agents qui s'intercalent dans l'ADN causant ainsi, des changements dans sa conformation et des erreurs dans l'ADN. Aussi les agents de la famille des platiniens peuvent affecter

la réplication de l'ADN (DORR et VON HOFF, 1994). De plus, les erreurs causées dans l'ADN par ces agents induit l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. La mort cellulaire induite par les composés de la famille des platiniens tels le cisplatine ou le carboplatine semble se faire via la voie de signalisation JNK, une voie activée lors d'un stress cellulaire (BOULIKAS et VOUGIOUKA, 2003) . Le paclitaxel (appelé aussi Taxol), quant à lui, est un agent qui permet l'assemblage des filaments de microtubules et les empêche de se dépolymériser en les stabilisant (DORR et VON HOFF, 1994; ORR et al., 2003, AHN et al., 2004). Cette stabilisation permet donc de bloquer le cycle cellulaire en empêchant les cellules d'entrer en phase M. De plus, le Taxol induit l'apoptose en régulant l'expression ou l'activité de plusieurs protéines associées à l'apoptose telles que Bcl-2, Bcl-X, p21^{WAF} ainsi que le TNF- α (ANH et al., 2004). Dans la plupart des lignées tumorales, l'induction de l'apoptose par le Taxol se fait d'une manière caspase-dépendante. Cependant, dans certaines lignées cellulaires comme la lignée de cancer ovarien SKOV3, l'induction de l'apoptose semble s'effectuer de façon caspase-indépendante (ANH et al., 2004), ce qui laisse présager que l'action du Taxol sur les lignées cancéreuses se fait de façon cellule-spécifique.

2.7. Propriétés et cascades métastatiques de cellules cancéreuses

2.7.1. Acquisition d'un potentiel de réplication illimité

En plus d'avoir des oncogènes activés et des gènes suppresseurs de tumeur mutés, une cellule cancéreuse doit acquérir un potentiel de réplication illimitée. Ce potentiel s'obtient via une activation de la télomérase. L'activité de la télomérase est un phénomène qui est impliqué dans plusieurs processus cellulaires tels que la division cellulaire, la prolifération, l'immortalisation et la sénescence cellulaire (SALDANHA et al., 2003). Dans une cellule normale, chaque division cellulaire induit la perte d'environ 50 à 200 paires de bases de séquence télomérique (SALDANHA et al., 2003). Donc, au fur et à mesure que la cellule se divise, l'extrémité des chromosomes disparaît mais tant et aussi longtemps que la cellule n'aura pas atteint sa limite Hayflick, elle pourra se diviser. La limite Hayflick est un concept qui stipule que les cellules ont un nombre limite de division (SALDANHA et al., 2003). Les cellules immortalisées ou néoplasiques ayant une télomérase activée ont la capacité d'outrepasser cette limite et peuvent donc se diviser de façon illimitée. La réactivation de la télomérase est un événement rare dans le développement de cancers malins. Cependant, certains oncogènes (c-myc) et certaines mutations dans des gènes suppresseurs de tumeur (par exemple, p53, pRb et c-myc) permettent la réactivation de la télomérase (SALDANHA et al., 2003).

2.7.2. Prolifération incontrôlée

La capacité des cellules cancéreuses à proliférer de façon incontrôlée vient du fait qu'elles sont insensibles aux signaux intracellulaires et environnementaux leur dictant de ne pas proliférer. Cette insensibilité semble être causée par plusieurs facteurs tels que la sécrétion aberrante de facteurs de croissance autostimulant la cellule, la surexpression de récepteurs de facteurs de croissance et la perte du contrôle du cycle cellulaire (LODISH et al., 1999). De plus, plusieurs études démontrent que la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses provient aussi d'erreurs au niveau du contrôle du cycle cellulaire (MILDE-LANGOSH et RIETHDORF, 2003). Dans le cancer ovarien, la perte de la protéine p16^{INK4A} (mutée dans 20 à 33% cas de cancer ovarien) ou la surexpression de la cycline D1 mène à une augmentation de la phosphorylation de pRb et donc, à la relâche du facteur de transcription E2F (MILDE-LANGOSH et RIETHDORF, 2003) permettant de transcrire les gènes impliqués dans l'entrée en phase S du cycle cellulaire.

2.7.3. Angiogénèse

L'angiogénèse est une composante essentielle du développement d'une tumeur solide ainsi que pour le processus métastatique. Plusieurs facteurs angiogéniques sont exprimés par les tumeurs cancéreuses suggérant que celles-ci induisent leur propre vascularisation en activant les cellules endothéliales (BAMBERGER et PERRETT, 2002). Dans le cancer ovarien, il semble que le facteur angiogénique VEGF (vascular epithelial growth factor) est une composante majeure de la vascularisation des tumeurs ovariennes (BAMBERGER et PERRETT, 2002). Cette molécule semble être exprimée autant dans le

liquide cystique que dans l'ascite ou dans le sérum des patientes. L'expression de VEGF par les cellules tumorales ovariennes est essentiel pour qu'il y ait production d'ascite (BAMBERGER et PERRETT, 2002). Cependant, comparativement au cancer du sein, l'angiogénèse dans le cancer ovarien n'est pas un facteur qui augmente la progression et l'invasion du cancer donc ne peut pas être considéré comme un marqueur pronostique car ce phénomène est dépendant du type histologique des tumeurs (BAMBERGER et PERRETT, 2002).

2.7.4. Capacité d'invasion et de métastases

L'invasion est la capacité des cellules cancéreuses de pouvoir envahir un site adjacent. Lorsque les cellules acquièrent la capacité d'envahir un autre organe, on parle alors de métastase. Le processus d'invasion requiert trois étapes importantes : l'adhésion, la protéolyse et la migration (BROWN et al., 2000). L'adhésion implique que les interactions intercellulaires et les interactions entre les cellules et le stroma jouent un rôle clé dans la cascade métastatique. À l'aide du processus de clonalité, certaines cellules cancéreuses perdent des molécules importantes pour l'adhésion cellulaire comme des cadhérines et des intégrines (BROWN et al, 2000). Afin de pouvoir envahir un site adjacent, les cellules ayant perdu leur capacité d'adhésion doivent sécréter des protéases spécifiques MMP (*matrix metalloproteinase*) permettant de pouvoir dégrader la matrice extracellulaire et par le fait même, leur permettant de pouvoir rejoindre la circulation sanguine. La voie sanguine n'est pas la seule voie de dissémination possible, certaines cellules cancéreuses peuvent utiliser les vaisseaux lymphatiques pour atteindre d'autres

organes. D'autre part, certaines cellules n'utilisent ni un ni l'autre afin de pouvoir envahir d'autre site. C'est le cas des cellules de cancer ovarien qui envahissent d'autres organes se trouvant dans la cavité intrapéritonéale. Afin de pouvoir s'adhérer sur un autre organe, un autre processus de clonalité s'effectue. Seulement les cellules qui ont recommencé à exprimer des molécules d'adhésion peuvent ou pourront se fixer à un autre organe.

2.7.5. Résistance à l'apoptose et à l'anoïkose

La résistance à l'apoptose (mort cellulaire programmée) et à l'anoïkose (forme d'apoptose induite par la perte d'adhésion cellulaire) est un aspect important de la survie des cellules cancéreuses. Cette résistance peut être attribuable à des mutations sur des effecteurs extracellulaires (exemple : mutation dans les récepteurs de mort cellulaire) (LANE et al, 2004), à une insensibilité aux signaux pro-apoptotiques externes (LANE et al., 2004) ou à des mutations au niveau des effecteurs intracellulaires (exemple : surexpression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques, mutations inactivatrices des caspases, mutation dans la signalisation intracellulaires des récepteurs de mort cellulaire) (KAUFMANN et VAUX, 2003). Certaines évidences tendent à démontrer que la protéine Bcl-2 (protéine anti-apoptotique) pourrait être un joueur important dans la résistance à l'anoïkose. En effet, des études montrent que cette protéine pourrait prévenir l'apoptose médié par la signalisation induite par la protéine p53 lors d'un dommage à l'ADN (SANTINI et al., 2000). De plus, d'autres études utilisant des cellules intestinales de rat modifiée pour surexprimer Bcl-2 ont montré que ces cellules peuvent résister au

phénomène d'anoïkose lorsque celles-ci croissent en sphéroïde (agrégat cellulaire) (SANTINI et al., 2000). Certaines études utilisant des cellules de cancer ovarien suggèrent que Bcl-2 est impliqué dans la résistance à l'apoptose des cellules croissant en monocouche lors d'un traitement au Taxol mais que ce phénomène n'était pas observable lorsque ces mêmes cellules croissent en sphéroïde (MAKHIJA et al., 1999).

2.8. Modèles de cancer ovarien

2.8.1. Modèles cellulaires

Les modèles cellulaires in vitro proviennent d'échantillons biologiques et de tissus humains. Ils sont d'excellents modèles pour l'étude de la biologie et de la physiologie de la cellule épithéliale ovarienne (YUAN et al, 1997). À cette fin, deux types de modèles sont disponibles. D'abord, les modèles cellulaires constitués de cellules normales immortalisées in vitro de façon spontanées (GRÉGOIRE et al., 2001) ou via l'introduction de gènes transformants (par exemple, l'introduction des oncogènes E6 et E7 des papillomavirus (TSAO et al., 2001) ou l'antigène LT du virus SV40 (NITTA et al., 2001; DARIMONT et al., 2002)) sont des modèles utiles pour étudier la physiologie et les mécanismes moléculaires de l'épithélium ovarien. L'établissement de modèles cellulaires provenant de tissus de cancer ovarien ou d'ascite s'avère être un outil puissant pour comprendre les mécanismes moléculaires de ce type de cancer. Ces modèles sont habituellement caractérisés en évaluant des paramètres précis comme des paramètres de croissance, de clonogénécité et de tumorigénécité. D'autres caractéristiques, plus

spécifiques, telles que la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques ou d'intérêt thérapeutique, l'expression globale ou spécifique des protéines (comme les récepteurs de la famille EGFR et les molécules d'adhésion) et l'analyse des mutations dans les gènes sont aussi souvent étudiés. Ce type de modèles a permis l'établissement de plusieurs lignées cellulaires bien connues comme par exemple, les lignées **OVCAR, IGROV, OV-MZ, CAO, et SKOV** (WOODS et al, 1979; POELS et al, 1989; BIBLE et al., 2000; CONOVER et al., 1998; ERBA et al, 2000; LANGDON et al., 1998; LÉCURU et al., 2001; MÖBUS et al., 1992, MÖBUS et al., 2001; PROVENCHER et al., 2000; VERSHRAEGEN et al., 2003; WILSON et al., 1996; HAMILTON et al., 1983).

2.8.2. Modèles cellulaires en trois dimensions

Les modèles tridimensionnels sont des systèmes à mi-chemin entre les modèles cellulaires en monocouche et les modèles animaux. Ce type de modèle consiste à cultiver les cellules cancéreuses en absence d'adhésion à la matrice extracellulaire. L'agrégation des cellules entre elles, lorsqu'elles sont en suspension, permet la formation de sphéroïdes. Les modèles sphéroïdes sont largement utilisés dans des études portant sur le développement et la réponse aux drogues chimiothérapeutiques (MUELLER-KLIESSER, 1997), sur la survie cellulaire en suspension (anoïkose) (SANTINI et al., 2000; BATES et al., 2000), sur les mécanismes moléculaires d'invasion cellulaire, dans le processus métastatiques (BURLESON et al., 2004; SHEN et al., 2004; ROBINSON et al., 2003; CASEY et al., 2001; HAMILTON, 1998) ainsi que sur l'implication de l'angiogénèse dans la survie tumorale (SONODA et al., 2003).

2.8.3. Modèles animaux

Il existe plusieurs types de modèles animaux. Certains sont induits de façon chimique ou hormonale. L'avantage de ce type de modèle est que ceux-ci permettent d'étudier l'implication de carcinogènes sur la formation de tumeurs cancéreuses (VANDERHYDEN et al., 2003) Cependant, l'utilisation de ces agents ne permet pas pouvoir contrôler le type et la provenance des tumeurs induites. D'autres modèles animaux, tels que les animaux transgéniques, permettent d'étudier l'implication d'une protéine ou d'un gène précis dans le développement du cancer ovarien. Pourtant, malgré le fait que ce type de modèle est un outil génétique puissant, il comporte certaines limites comme par exemple, la difficulté à produire les animaux ainsi que l'instabilité génétique des gènes ciblés (VANDERHYDEN et al., 2003). De plus, ce type de modèle est très dispendieux à produire. Le type de modèles les plus souvent utilisés en oncologie est le modèle de xénogreffes de cellules cancéreuses humaines. Ce type de modèle animal permet de pouvoir utiliser les cancers humains dans un contexte physiologique réel. Cependant l'utilisation de ces animaux est limitée par le fait que la croissance tumorale in vivo est longue et ne permet donc pas d'obtenir des résultats à court terme (VANDERHYDEN et al., 2003). Tous ces modèles permettent de comprendre la pathophysiologie des cancers étudiés.

3. Objectifs du projet

Le cancer ovarien est une maladie dont l'étude est difficile. La difficulté de diagnostiquer la maladie de façon précoce, de la suivre et de la traiter de façon adéquate, et ce à long terme, constitue un obstacle majeur à la survie des patientes atteintes de ce cancer. De plus, l'avancement des connaissances fondamentales sur les événements précoces ainsi que sur la progression de la maladie est diminuée par le manque de modèles adéquats. L'établissement de nouveaux modèles cellulaires et animaux de cancer ovarien pourrait donc favoriser l'avancement de connaissances moléculaires et physiologiques de cette maladie. Afin d'établir de nouveaux modèles, des lignées cellulaires issues de patientes ayant un cancer ovarien ont été caractérisées *in vitro* mais aussi *in vivo*. Pour être utile en tant que modèles, ceux-ci doivent montrer une croissance *in vitro* et une propagation *in vivo*, posséder une croissance prédictible et reproductible, avoir une réponse thérapeutique similaire à celle retrouvée chez les femmes, conserver les mêmes caractères *in vivo* qu'*in vitro* et avoir une survie suffisante *in vivo* pour que des études post-opératoires ou post-implantatoires puissent être effectuées. De plus, ces nouveaux modèles sont validés en les utilisant lors de l'étude de la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et Bcl-X_L dans la survie des sphéroïdes de cancer ovarien en suspension.

4. Matériel et Méthodes

4.1. Provenance et historique médicale des échantillons biologiques

4.1.1. Lignée OVC-116-A

En mai 2002, une femme âgée de 76 ans présente un taux sanguin de CA125 élevé et une biopsie d'une masse pelvienne est effectuée. Le rapport de pathologie indique que cette masse pourrait être d'origine ovarienne. Suite à ce rapport, la patiente reçoit 3 cycles de Taxol-Carboplatin comme chimiothérapie. Par la suite, une cytochirurgie ainsi qu'une intervention de type SOB sont effectuées en juillet 2002. L'analyse pathologie des tissus prélevés montre un carcinosarcome hétérologue bilatéral provenant d'une tumeur müllerienne maligne mixte. Le rapport de pathologie de cette patiente mentionne aussi qu'elle présente aussi des implants métastatiques de MMMT au niveau de l'épiploon, du péritoine viscéral et au niveau de la glande iliaque externe. Après cette chirurgie, la patiente a reçu 6 cycles de Taxol-Carboplatin comme chimiothérapie. Jusqu'à ce jour, la patiente est toujours vivante.

4.1.2. Lignée COV-2

En novembre 1998, une femme âgée de 63 ans présente un taux élevé de CA125 sanguin ainsi qu'une masse au niveau des ovaires. Une cytochirurgie ainsi qu'une intervention de type SOD sont donc effectuées. Lors de la chirurgie, 5 litres d'ascite sont retirés. L'analyse pathologique des échantillons montre un adénocarcinome séropapillaire non différencié de grade 3 avec un remplacement partiel de l'ovaire et des extensions péritonéales au niveau du péritoine pelvien, au niveau de la région paracolique droite et sigmoïde de l'intestin ainsi qu'à la région sous-hépatique. La patiente présente aussi une invasion massive de l'appendice, une invasion multifocale de l'épiploon ainsi que plusieurs extensions sur la surface hépatique. Après ce diagnostic, la patiente a reçu 9 cycles de Carboplatin-Taxol comme chimiothérapie et 4 cycles de Topotecan. La patiente a ensuite développé une résistance à cet agent. Elle reçut donc 1 cycle d'Hexalene. Dû à une non-réponse et au développement de plusieurs complications médicales, la chimiothérapie fut terminée. La patiente décède en janvier 2000.

4.2. Culture cellulaire

Les lignées OVC-116-A et COV-2 proviennent de patientes ayant été diagnostiquées avec un cancer ovarien au Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke (Campus de Fleurimont). L'ascite de ces patientes a été obtenue, avec leur consentement (formulaire de consentement approuvé par le comité de déontologie du CHUS), lors de leur chirurgie. Ceux-ci ont été centrifugés à 1000 rpm pendant 15 minutes à une température de 4°C. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 5 ml de milieu de culture complet et ensemencés dans un flasque pour culture cellulaire primaire T-25 (Sarstedt, Newton, NC, USA). Les cultures cellulaires ont été incubées à 37°C dans un incubateur ayant un atmosphère comprenant 95% d'air et 5% de CO₂. Lorsque les cultures cellulaires ont atteint 85% de confluence, les cellules ont été lavées une fois avec 2 ml de PBS et décollées avec 500 µl d'une solution de trypsine [0,05%] et d'EDTA [0,53 mM] (Wisent, St-Bruno, QC, CAN) et ré-ensemencées dans 10 ml de milieu de culture complet dans un flasque à culture cellulaire primaire T-75 (Sarstedt, Newton, NC, USA). Les cellules sont incubées à nouveau dans les mêmes conditions jusqu'à l'obtention de la confluence désirée ou passée dans un ratio de 1:5 dans d'autres T-75. À chaque fois que les flasques ont atteint au moins 85% de confluence, les cellules ont été congelées dans un milieu contenant 95% de FBS et 5% de DMSO (Sigma, St-Louis, MA, USA). À chaque passage cellulaire, les cellules ont été congelées et entreposées dans de l'azote liquide.

La lignée OVC-116-A croît dans le milieu OSE, un mélange 1 : 1 de milieu 199 et de milieu MCDB (Wisent, St-Bruno, QC, CAN), supplémenté avec 10% de FBS, 4 mM de L-glutamine (Wisent, St-Bruno, QC, CAN), 100 U/ml de pénicilline (Wisent, St-Bruno, QC, CAN.), 100 µg/ml de streptomycine (Wisent, St-Bruno, QC, CAN), 2,5 µg/ml de fungizone (Wisent, St-Bruno, QC, CAN) et 10 nM de β -estradiol (Sigma, St-Louis, MA, USA). La lignée COV-2 croît dans du milieu DMEM/F12 (Wisent, St-Bruno, QC, CAN) supplémenté avec 20% de FBS et les mêmes concentrations de L-glutamine, de pénicilline, de streptomycine et de fungizone que la lignée OVC-116-A. Le milieu de culture de chaque lignée cellulaire a été changé trois fois par semaine et les cellules ont été passées dans un ratio de 1 : 5 dans le même T-75 pour un maximum de trois passages sauf pour la lignée COV-2 dont chaque passage a étéensemencé dans un nouveau flasque T-75. D'autres lignées cellulaires ont été utilisées à des fins de contrôle pour chaque expérience. Le tableau 2 résume toutes les lignées cellulaires utilisées ainsi que leurs conditions de croissance.

Tableau 2

Condition de culture des lignées cellulaires utilisées¹

Lignée	milieu de base	% FBS	β -estradiol ²	hydrocortisone ³	Insuline ⁴	héréguline $\beta 1$ ⁵	Acides aminés non-essentiels
OVC-116-A	OSE	10	X				
COV-2	DMEM/F12	20					
(ATCC) OVCAR-3	RPMI 1640	20			X		
SKOV-3 ip1	DMEM/F12	10					
SKOV-3	DMEM/F12	10					
CaOV-3	DMEM/F12	10					
MCF-7	DMEM/F12	2,5	X	X	X	X	
OVN-13-T	OSE	10	X				
OVCA 433	EMEM	10					X
OVN-95-T	OSE	10	X				

1. Tous les milieux de culture des lignées cellulaires utilisées sont complétés par de la L-glutamine 4 mM, de la pénicilline 100U/ ml, de la streptavidine 100 μ g/ml et de la fungizone 2,5 μ g/ml.
2. La concentration de β -estradiol (Sigma, St-Louis, MS, USA) utilisée est de 10 nM.
3. La concentration d'hydrocortisone (Sigma, St-Louis, MA, USA) utilisée est de 400 μ g/ml
4. La concentration d'insuline (Wisent, St-Bruno, QC, CAN) utilisée est de 10 μ g / ml
5. La concentration d'héréguline $\beta 1$ (Upstate Biotech, Lake Placid, NY, USA) utilisée est de 10 ng /ml

4.3. Caractérisation morphologique des lignées cellulaires

4.3.1. Caractérisation phénotypique

Les lignées cellulaires croissent en monocouche jusqu'à l'obtention d'une confluence se situant entre 70 et 80%. À cette confluence, les lignées sont analysées pour leurs caractéristiques morphologiques avec un microscope à contraste de phase Olympus CK40 en utilisant l'objectif de 10X. Les cultures sont analysées selon trois critères (BAR et HARLOZINSKA, 2000) : la morphologie cellulaire (grosueur, forme et bordure), la morphologie du noyau (nombre de noyau, forme, localisation et présence de nucléole) et les caractéristiques du cytoplasme (grosueur, présence de vacuoles, ratio noyau/cytoplasme (ratio N/C)).

4.3.2. Caractérisation par microscopie électronique à balayage

Chaque lignée cellulaire a été caractérisée de façon microscopique avec un microscope électronique à balayage *Hitachi S.3000N*. Pour faire l'analyse, les cellules sontensemencées sur des lamelles rondes en verre (Canemco inc., Montréal, QC, CAN) et incubées jusqu'à ce que les cellules atteignent 50 à 70% de confluence. Par la suite, les cellules sont lavées deux fois pendant quelques secondes avec du cacodylate de sodium (Electron microscopic Sciences, Washington, PA, USA) [0,1 M] à pH 7,2 préalablement chauffé à 37°C. Les cellules sont ensuite pré-fixées avec un mélange 1 : 1 de glutaraldéhyde [1,4%] dilué dans du cacodylate de sodium [0,1M] pH 7,2 et du milieu de culture. Pendant 15 minutes à 37°C, les cellules sont fixées avec du glutaraldéhyde [2,8%] dilué dans du cacodylate de sodium [0,2 M] pH 7,2 pendant 30 minutes à 4°C. Après la fixation, les cellules sont lavées deux fois avec du cacodylate de sodium [0,1M] pH 7,2 pendant 3 minutes. Les cellules sont fixées une deuxième fois avec du tétraoxyde

d'osmium (OsO_4) [1%] dilué dans du cacodylate de sodium [0,1 M] pH 7,2 pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du cacodylate de sodium [0,1M] pendant trois minutes. Après ces lavages, les cellules subissent une série de déshydrations en utilisant des concentrations ascendantes d'éthanol (30%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95%) pendant trois minutes à la température de la pièce. Pour s'assurer que les cellules sont bien déshydratées, elles sont incubées trois fois pendant 3 minutes dans de l'éthanol 100%. Les échantillons sont ensuite transférés dans l'appareil de séchage par point critique (CPD) et les échantillons sont déshydratés à nouveau avec du CO_2 pendant 3 minutes à la température de la pièce. Les lamelles sont montées sur un porte-échantillon et sont métallisées avec un mélange d'or et de palladium par pulvérisation cathodique. Après la métallisation, les échantillons sont prêts à être visualisés au microscope électronique à balayage.

4.4. Expression de marqueurs cellulaires spécifiques

4.4.1. Marqueurs sécrétés

Les marqueurs sécrétés CA125, CA15.3 et ACE ont été analysés dans le milieu de culture conditionné de chaque lignée cellulaire par chimioluminescence. Ces analyses ont été effectuées par le laboratoire de biochimie clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Pour ce faire, les cellules sont ensemencées dans un T-75 et incubées jusqu'à l'obtention d'une confluence de 100%. À cette confluence, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées une fois avec du 5 ml de PBS. Après le lavage, 10 ml de milieu de culture complet sont ajoutés aux cellules. Les T-75 sont incubés pendant 48 heures à 37°C. Après cette incubation, le milieu de culture est prélevé, centrifugé pendant 5 minutes à 1000 rpm et le surnageant est envoyé pour l'analyse en biochimie clinique. Le nombre de cellules dans chaque T-75 est compté car les résultats expriment le nombre d'unité de marqueur par million de cellule. Des contrôles de milieu de culture non-conditionné ainsi que de milieu conditionné de cellules OVCAR-3 ont été insérées dans l'expérience.

4.4.2. Analyses de marqueurs cellulaires par immunobuvardage de type Western

Cette méthode a été employée pour l'analyse de marqueur provenant de cellules croissant en monocouche ou de culture en sphéroïdes sur un polymère de poly-HEMA (voir section 3.5.3.) Les cellules sont lavées une fois avec du PBS. Ensuite, elles sont lysées dans du tampon NP40 [1X] contenant les inhibiteurs de protéases et de phosphatases suivants : AEBSF [1 µg / ml] (Sigma, St-Louis, MA, USA), leupeptine [0,5 µg/ml] (Sigma, St-Louis, MA, USA), aprotinine [20 µg/ml] (Sigma, St-Louis, MA, USA), pepstatine A (Sigma, St-Louis, MA, USA) [0,7 µg/ml], orthovanadate (Sigma, St-Louis, MA, USA) [250 µM] pH 10, pyrophosphate de sodium ($\text{Na}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$) (Sigma, St-Louis, MA, USA) [100 µM] et du fluorure de sodium (NaF) (Sigma, St-Louis, MA, USA) [10 mM]. Les cellules sont lysées 30 minutes sur glace. Le contenu en protéines de ces lysats est évalué par la méthode de dosage de protéines Bradford (BioRad, Hercules, USA). Trentes (30) microgrammes de protéines sont dénaturées en présence de β -mercaptoéthanol à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines sont ensuite migrées sur des gels de polyacrylamide pendant environ 1 heure et demi en utilisant un courant de 150 V. Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF pendant un minimum de 1 heure en utilisant un courant de 300 mA. Les membranes sont bloquées pendant une heure avec du PBS-TWEEN [0,1%] (1 ml de TWEEN 20 dans 1L de PBS [1X]) contenant 4% de lait (Carnation, North York, ON, CAN). Après le blocage, les membranes sont hybridées avec des anticorps primaires dilués dans du PBS-TWEEN/ lait 4% pendant une nuit. Le lendemain, les anticorps sont retirés et les membranes sont lavées trois fois pendant 10 minutes avec du PBS-TWEEN [0,1 %]. Les membranes sont hybridées ensuite avec une dilution d'anticorps secondaires couplés avec la peroxydase pendant 45 minutes. Les membranes sont lavées trois fois pendant 20 minutes avec PBS-TWEEN [0,1 %]. Les bandes sont révélées par chimioluminescence à l'aide du ECL+

(Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, ENG) et imprimées sur un film de radiographie (KODAK, Mexico, MEX.) (BAUDIN et al.,2004). L'hybridation avec les anticorps sont résumés dans le tableau 3 et 4 .

4.4.3. Analyse de marqueurs cellulaires par immunofluorescence indirecte sur lame

Cette méthode a été employée pour l'analyse de marqueur provenant de cellules croissant en monocouche ou de culture en sphéroïdes sur un polymère de poly-HEMA (voir section 3.5.3.). La technique d'immunofluorescence indirecte sur lame a été utilisée pour mettre en évidence des marqueurs cellulaires comme MUC-1, CA125, les cytokératines 8 et 18 et l'antigène humain de membrane épithéliale. Les cellules sont adhérentes sur une lame de microscope stérile (Surgipath, Winnipeg, MA., CAN) et incubées jusqu'à l'obtention de 50 à 70% de confluence. À cette confluence, les lames sont lavées une fois dans du PBS et ensuite fixées 10 minutes à -20°C avec du méthanol. Si l'échantillon provenait d'un bloc cellulaire contenant des sphéroïdes dans la paraffine, les lames contenant une coupe cellulaire de $3\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur sont déparaffinées 15 minutes sur un bloc chauffant à 56°C et réhydratées selon l'ordre suivant : 2 lavages de 5 minutes dans du xylène, 2 lavages de 2 minutes dans de l'éthanol 100%, 2 lavages de 1 minute dans de l'éthanol 95%, 1 lavage de 1 minute dans de l'éthanol 80%, 1 lavage de 1 minute dans de l'éthanol 70% et 3 lavages de 2 minutes dans de l'eau distillée. Par la suite les lames sont placées dans du tampon citrate [0,01M] pH 6,0 que l'on amène et maintient à ébullition pendant 15 minutes. Les lames sont refroidies à la température de la pièce pendant 20 minutes et placer dans du PBS-A froid. Le reste du protocole s'applique autant pour les lames provenant de coupes histologiques que pour les lames contenant des cellules en monocouche. Les cellules sont perméabilisées pendant 5 minutes avec du PBS-Triton [0,1%] et lavées avec du PBS-A froid

pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite bloquées en utilisant du PBS-A/ BSA [2%] pendant 45 minutes. Après le blocage, on incube les lames avec l'anticorps primaire dilué pendant une heure. Après cette incubation, les lames sont lavées trois fois avec du PBS-A froid et après, on les incube avec l'anticorps secondaire couplé au fluochrome (Texas-Red ou Oregon-Green) pendant 45 minutes dans le noir. Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, les lames sont lavées deux fois avec du PBS et montées dans le noir en y ajoutant une goutte de milieu de montage (Sigma, St-Louis, MA, USA) et une lamelle de verre dont on scelle les côtés avec un fixatif transparent. Les lames sont visualisées avec un microscope à fluorescence Olympus 1X70. (BAUDIN et al.,2004). Les conditions d'utilisation des différents anticorps utilisés sont tous listés dans le tableau 3 et 4.

Tableau 3

Anticorps primaires utilisés

Nom	provenance	Clone	compagnie	Dilution WB	Dilution IF
Anti Bax	lapin	N-20	Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	1 : 400	-
Anti Bcl-2	mouse	124	DAKO, Carpinteria, CA, USA	1:1000	-
Anti Bcl-X _L	lapin	2762	Cell Signaling, Pickering, ON, CAN	1 : 1000	-
Anti CA125	souris	OC125	Signet Laboratory, Dedham, MA, USA	-	1 : 500
Anti caspase 3	lapin	9662	Cell Signaling, Pickering, ON, CAN	1 : 1000	-
Anti caspase 9	lapin	9502	Cell Signaling, Pickering, ON, CAN	1 : 1000	-
Anti CK 8-18	souris	Zym 5,2	Zymed, San Francisco, CA, USA	-	1 : 500

Anti E-cadhérine	souris	36	BD Transduction	1 : 500	-
Anti EGFR	lapin	1005	Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	1 : 500	-
Anti ErbB2	souris	E2-4001	Neomarkers, Freemont, CA, USA	1 : 1000	-
Anti GAPDH	souris	6C5	RDI, Flanders, MA, USA	1 : 40000	-
Anti human epithelial antigen	souris	Ber-Ep4	DAKO, Carpentries, CA, USA	-	1 : 300
Anti MUC-1	souris	VU4H5	Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	-	1 : 250
Anti N-cadhérine	lapin	H63	Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	1 : 300	-
Anti PARP	lapin	9542	Cell Signaling, Pickering, ON, CAN	1 : 1000	-
Anti P-cadhérine	lapin	H105	Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	1 : 300	-
Anti récepteur d'œstrogène	souris	Ab-4	Oncogene, San-Diego, CA USA	1 : 100	-
Anti α -tubuline	souris	B-5-1-2	Sigma, St-Louis, MA, USA	1 : 40000	-

Tableau 4**Anticorps secondaires utilisés**

Anticorps	Provenance	Compagnie	Dilution WB	Dilution IF
Anti souris IgG conjugué à la peroxydase (HRP)	Âne	Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, ENG.	1: 10000	-
Anti lapin IgG conjugué à la peroxydase (HRP)	Âne	Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, ENG	1 : 10000	-
Anti souris IgG conjugué à l'Oregon Green	Chèvre	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	-	1 : 1000
Alexa Fluor 594 Anti souris conjugué au Texas Red	Chèvre	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	-	1 : 1000

4.4.4. Analyses mutationnelles des lignées cellulaires

Les mutations dans les gènes TP53, BRCA1, BRCA2 et de KRAS ont été analysées en collaboration avec le laboratoire du Dre Patricia Tonin de l'Université McGill. Pour chaque lignée cellulaire, l'ADN génomique a été extrait et analysé pour la recherche de mutations dans les exons 5 à 9 du gène TP53, pour la recherche de mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 les plus fréquemment retrouvées dans la population féminine canadienne française et dans les codons 12 et 13 du gène KRAS par la méthode SSCP. La mutation C4446T du gène BRCA1 et les mutations G6085T et 8765delAG du gènes BRCA2 ont été recherchées (TONIN et al., 1998; TONIN et al., 2001). Pour chaque réaction, 200 à 300 ng d'ADN sont utilisés à lesquelles on

ajoute du tampon de PCR [1X], 100 ng de chaque sonde spécifique, 2,5 pmol de dCTP, de dGTP et de dTTP, 0,3125 pmol de dATP, 0,5 U de polymérase Taq et 1,25 U de S35-dATP (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, ENG). Une réaction de PCR est effectuée selon un cycle comprenant une incubation de 15 secondes à 94°C suivis de 15 secondes à 55°C et se terminant par une incubation de 30 secondes à 72°C. Trente-cinq cycles ont été effectués pour chaque gène analysé. Les produits de PCR pour les mutations du gène BRCA1 ont été migrés sur un gel SSCP contenant 5% polyacrylamide et 5% glycérol. Les produits de PCR pour les mutations analysées du gène BRCA2 ont été migré sur un gel SSCP contenant 6% polyacrylamide et 5 % de glycérol. Les gels ont été migrés à la température de la pièce pendant 18 heures en utilisant une charge de 2 W. Les gels sont séchés et autoradiographiés pendant 2 à 5 jours. Les mêmes conditions ont été utilisées pour les mutations du gène TP53 sauf que les produits de PCR ont été migré à 4°C sur un gel SSCP pendant 4 heures en utilisant une charge de 25 W. Pour la recherche de mutations dans les codons 12 et 13 du gène KRAS, les mêmes conditions ont été effectuées mais le PCR s'est fait de la façon suivante : 3 minutes à 95°C suivis de 35 cycles de 15 secondes à 94°C, 15 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C. Le produit de PCR est dénaturé et migré sur un gel dénaturant contenant 5% de polyacrylamide (TONIN et al., 1998; TONIN et al., 2001).

4.5. Paramètres de croissance

4.5.1. Courbe de croissance et évaluation du temps de génération

Pour chaque lignée cellulaire, 10 000 cellules ont étéensemencées dans 10 T-25. À tous les jours, pendant 10 jours, les cellules d'un T-25 sont lavées et trypsinisées selon la procédure normale de passage de culture cellulaire. Après la centrifugation, les culots de cellules sont resuspendus dans 10 ml de milieu de culture complet. Le nombre de cellules de ce mélange est compté avec un hématimètre en utilisant du Bleu de Trypan [0,5%]. Les comptes ont été fait en triplicata et trois

expériences indépendantes ont été faites. Une courbe de croissance du nombre de cellules en fonction du temps est réalisée et le temps de génération est évalué dans la phase exponentielle de croissance selon la formule suivante : $g = t / n$

Où

g = temps de génération

t = temps écoulé ($= t_1 - t_0$)

n = nombre de génération ($= 3,3 \times (\log N_1 - \log N_0)$)

N = nombre de cellule à un temps donné

4.5.2. Évaluation de la clonogénécité

4.5.2.1. Clonogénécité en condition adhérente

Les cellules sontensemencées à basse densité (100 cellules) dans une plaque 6-puits contenant du milieu de culture complet. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 14 jours. Après l'incubation, les cellules sont lavées et fixées pendant 10 minutes à -20°C en utilisant du méthanol. Les cellules sont ensuite colorées en utilisant du Bleu de Coomassie [0,2%] pendant 2 minutes. Les colonies colorées sont comptées et le pourcentage d'efficacité clonogénique est calculé en divisant le nombre de colonie comptée par le nombre initial de cellulesensemencées.

4.5.2.2. Clonogénécité en condition non-adhérente

Dans un pétri de 60 mm de diamètre, dont le fond été recouvert préalablement par un mélange 1 : 1 d'agar (EMD Chemical, Gibbstown, NJ, USA) [1,33 %] et de milieu de culture complet concentré deux fois, est ajouté 10 000 cellules qui sontensemencées dans un mélange 1 : 1 d'agar [0,66 %] et de milieu de culture complet [2X]. Lorsque que cette couche d'agar mou est

solidifiée, une troisième couche, identique à celle du fond est rajoutée sur la partie contenant les cellules. Lorsque celle-ci est solidifiée, 1 ml de milieu de culture est déposé sur les couches d'agar et le pétri est incubé 1 mois à 37°C. À chaque semaine, le milieu de culture est changé. Après l'incubation, les colonies formées dans l'agar sont comptées et les pourcentages d'efficacité clonogénique est évalué en divisant le nombre de colonies comptées par le nombre initial de cellulesensemencées.

4.5.3. Croissance et viabilité en sphéroïdes

Afin d'évaluer la croissance en sphéroïdes, 10 ml d'une suspension cellulaire de 150 000 cellules par millilitre sontensemencés dans un pétri de 10 cm de diamètre préalablement recouvert d'un mélange 1 : 1 d'agar [1,2 %] et de milieu de culture complet [2X] ou recouvert de poly-HEMA (Sigma, St-Louis, MA, USA). Le pétri contenant les cellules est incubé à 37°C pendant un minimum de 24 heures (FUKAZAWA et al., 1995).

4.5.3.1. Viabilité des sphéroïdes en utilisant la méthode de double coloration à l'iodure de propidium et à l'orangé d'acridine

La viabilité des cellules croissant en sphéroïdes est évaluée par trois méthodes différentes. La première consiste en une double coloration à l'iodure de propidium et à l'orangé d'acridine (BANK, 1988). Pour ce faire, des sphéroïdes sont formés en utilisant de l'agar comme couche de fond. Après 2 et 6 jours d'incubation, les sphéroïdes sont récoltés, centrifugés 5 minutes à 1000 rpm et lavés une fois avec du PBS. Les sphéroïdes sont ensuite colorés dans le noir en utilisant une solution contenant 0,67 µM d'Orangé d'Acridine (Sigma, St-Louis, MA, USA) et 75 µM

d'Iodure de Propidium (Sigma, St-Louis, MA, USA) dans du PBS. Après la coloration, les sphéroïdes sont centrifugés 5 minutes à 1000 rpm et lavés une fois avec du PBS. La viabilité en sphéroïdes est évaluée sous la lumière bleu d'un microscope à fluorescence *Leitz* modèle *BMRBE*. La viabilité des sphéroïdes a été constatée visuellement selon les critères suivants : les cellules apparaissant vertes sont considérées comme vivantes et les cellules apparaissant rouge sont considérées comme mortes.

4.5.3.2. Viabilité des sphéroïdes : techniques de la croissance post-sphéroïde

Afin de vérifier la viabilité des lignées cancéreuses lorsqu'elles croissent en sphéroïde, des sphéroïdes sont formés à partir d'une suspension cellulaire de 150 000 cellules par millilitre dans une plaque 6-puits dont le fond de chaque puit est recouvert de poly-HEMA. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24 h, 48 h et 72 h. Après chaque temps d'incubation, les sphéroïdes sont récoltés et ré-ensemencés dans un puit d'une seconde plaque 6-puit mais sans poly-HEMA cette fois-ci. Cette plaque est incubée à 37°C pendant toute la nuit. Le lendemain, les cellules sont lavées une fois avec du PBS, fixées 10 minute avec 1ml de méthanol à -20°C et colorées avec du Bleu de Coomassie. La perte de viabilité en sphéroïde est constater par la diminution de la coloration bleue dans le fond des puits de la plaque 6-puits.

4.5.3.3. Viabilité des sphéroïdes : technique de la visualisation de la mortalité intra-sphéroïde via une coloration à l'Iodure de Propidium

Afin de vérifier la mortalité intra-sphéroïde des lignées cancéreuses lorsqu'elles croissent en sphéroïde, des sphéroïdes sont formés à partir d'une suspension cellulaire de 150 000 cellules par millilitre dans une plaque 6-puits dont le fond de chaque puit est recouvert de poly-HEMA. Les

cellules ont été incubées à 37°C pendant 24 h, 48 h et 72 h. Après chaque temps d'incubation, les sphéroïdes sont récoltés et centrifugés à 1000 rpm pendant 3 minutes et lavés une fois avec 1 ml de PBS. Les sphéroïdes sont ensuite colorés 10 minutes dans le noir avec 500 µl d'une solution de PBS contenant 75 µM d'Iodure de Propidium. Après la coloration, les sphéroïdes sont centrifugés et lavés une fois avec 1 ml de PBS. Après ce lavage, les sphéroïdes sont recentrifugés à nouveau et resuspendus dans 1 ml de PBS. La mortalité intra-sphéroïde est visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

4.6. Évaluation moléculaire de la résistance à l'apoptose et à l'anoïkose

L'apoptose a été évalué dans les lignées cellulaires croissant en monocouche et en sphéroïde par deux méthodes : par l'évaluation par immunobuvardage de type Western du statut moléculaire des protéines de la famille des homologues Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L et Bax) et de certains effecteurs de l'apoptose (caspase 3, caspase 9, PARP) et par l'évaluation en cytométrie de flux du pourcentage d'apoptose (LANE et al., 2003).

4.6.1. Évaluation par immunobuvardage de type Western de protéines impliquées dans l'apoptose

Le statut moléculaire des protéines de la famille des homologues Bcl-2 ainsi que d'autres molécules impliquées dans l'apoptose est évalué par immunobuvardage de type Western (voir section 4.4.2.) sur des cellules croissant en monocouche et en sphéroïde incubés entre 24 et 48 heures. Des contrôles comparatifs incluant la lignée cellulaire de cancer ovarien OVCAR-3 et les lignées cellulaire de cellules normales de la surface épithéliale ovarienne OVN-13-T

et OVN-95-T ont été utilisés. Les conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires utilisés dans cette expérience sont résumées dans les tableaux 3 et 4.

4.6.2. Évaluation de l'induction de l'anoïkose en sphéroïde par une méthode ÉLISA

L'induction de l'anoïkose est évaluée par une méthode immunologique de type ELISA. Pour ce faire, un ensemble *Cell Death Detection* ELISA (Roche Applied Science, Penzberg, GER) est utilisé. Cet ÉLISA permet de quantifier l'apoptose en déterminant de façon spécifique la présence de mono et oligonucléosome dans la fraction cytoplasmique d'un lysat cellulaire. Pour ce faire, les lignées cellulaires (OVC-116-A, COV-2 et OVN-95-T) croissent sans adhésion en sphéroïde dans des pétris recouvert de poly-HEMA. Au temps 24 heures 48 heures et 72 heures, les cellules sont récoltées et séparées dans deux tubes de 15 ml. Les cellules du premier tube sont lysées à l'aide de 500µl de tampon de lyse NP40 contenant des inhibiteurs de protéases. Les lysats sont dosés par la méthode Bradford. Un contrôle de 50 000 cellules est aussi lysé pour chaque lignée cellulaire utilisée afin de savoir la quantité de protéine associée à ce nombre de cellule. Les cellules du deuxièmes tubes sont lysées à l'aide de la solution Incubation Buffer fournie par l'ensemble ELISA. Dans une plaque ELISA dont les puits sont préalablement recouverts d'un anticorps anti-histone, un équivalent protéique de 1000 cellules pour chaque lignée cellulaire estensemencé dans les puits de la plaques et incubé 90 minutes à la température de la pièce. Après l'incubation, les puits sont lavés avec la solution de lavage fournie par l'ensemble ELISA et 100 µl d'une solution contenant un anticorps anti-ADN-POD sont ajoutées. La plaque est incubée 90 minutes à la température de la pièce. Après l'incubation, les puits sont lavés avec la solution de lavage et 100 µl d'une solution de substrat sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée 5 minutes dans le noir et lue à 410 nm dans un lecteur de plaque ELISA.

4.7. Sensibilité aux agents chimiothérapeutiques

Dix-huit mille cellules sont ensemencées en triplicata dans des puits d'une plaque 96-puits et incubées à 37°C pendant 24 heures. Lorsque les cellules sont adhérentes, le milieu de culture de chaque puit est remplacé par du milieu de culture complet contenant des concentrations ascendantes d'agent chimiothérapeutique à tester. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 4 jours. Après cette incubation, l'IC₅₀ (la concentration d'agent thérapeutique tuant 50% de la population cellulaire) est évaluée en effectuant un test XTT (voir section 4.7.1.). Trois essais indépendants ont été effectués pour chaque agent. Les agents testés sont des drogues chimiothérapeutiques fréquemment utilisés dans le traitement du cancer ovarien ainsi qu'un agent d'intérêt thérapeutique. Le Cisplatine (Faulding, Montréal, QC, CAN) a été testé en utilisant des concentrations se situant entre 0,1 µM et 200 µM (Lane et al., 2004). Le Taxol (Bristol-Meyers, New-York, NY, USA) a été testé en utilisant des concentrations se situant entre 1 µM et 10 mM (Lane et al, 2004). L'apoptose induit par TRAIL (PrepoTech Canada inc., Ottawa, ONT, CAN) a été mesuré en utilisant des concentrations de TRAIL se situant entre 25 ng/ml et 500 ng/ml (LANE et al, 2004).

4.7.1. Essai XTT

L'essai XTT permet d'évaluer la prolifération cellulaire selon le critère de l'activité métabolique des cellules. Pour ce faire, 10 mg de poudre XTT (Sigma, St-Louis, MA, USA) sont dilués dans 10 ml de PBS et incubés 30 minutes à 60°C dans le noir. Par la suite, cette solution est filtrée sur un filtre 0,22 micron et 10 ml de milieu de culture DMEM/F12 sans rouge de phénol (Sigma, St-Louis, MA, USA) ainsi que 15 µl de phénylméthysulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, St-Louis, MS, USA) sont ajoutés. Toujours dans la noirceur, le milieu des puits des plaques 96-puits est

minutes dans la noirceur et la densité optique est lue sur un lecteur de microplaque *Sunrise TECAN* en utilisant une longueur d'onde de 450 nm (BAUDIN et al., 2005)

4.8. Caryotype spectral

Le caryotype spectral de chaque lignée cellulaire a été fait en collaboration avec le laboratoire du Dr Jeremy Squire de l'Université de Toronto. L'analyse SKY a été effectuée sur des lames contenant des cellules en métaphase et en utilisant la technique SKY Paint effectuée selon les instructions du fabricant (ASI, Carlsbad, CA, USA) (Bayani et al., 2002, Schrock et al., 1996). Les lames contenant des cellules en métaphase sont pré-traitées 5 minutes avec une solution de pepsine dans du HCl [0,01M] à 37°C suivies par une incubation de 5 minutes à 37°C avec du PBS et une solution de PBS/MgCl₂ à la température de la pièce. Avant le processus d'hybridation, les lames sont fixées 10 minutes à la température de la pièce avec une solution de PBS/MgCl₂ contenant 1 % de formaldéhyde et déshydratées à l'aide d'une série d'éthanol en concentration ascendante. Les cellules sont ensuite dénaturées pendant 2 minutes à 72°C dans une solution de SSC [2X] contenant 70% de formamide et les lames sont par la suite déshydratées à nouveau. L'hybridation, les lavages et la détection des lames sont effectuées selon une procédure publiée (BAYANI et al., 2002). La nomenclature décrivant le karyotype représente seulement les aberrations clonales. Un gain de chromosome est identifié lorsqu'il est reproductible dans au moins deux métaphases, une perte chromosomale est identifiée lorsque celle-ci est retrouvée dans au moins trois métaphases tandis qu'un réarrangement chromosomal doit être retrouvé dans au moins deux métaphases pour être valide.

4.9. Essai de tumorigénicité *in vivo*

La croissance *in vivo* de chaque lignée cellulaire a été évaluée par deux méthodes. La première consiste en des injections sous-cutanées de 10 millions de cellules cancéreuses dans les flancs (4 injections par souris) de souris NUDE CD1 (n = 3) et de souris SCID (n = 2) âgées de 6 à 8 semaines sous anesthésie générale induite par l'injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine/xylazine. Tous les animaux ont été observés à toutes les semaines jusqu'à ce que les tumeurs aient un diamètre maximal de 1 cm. À cette grosseur, les souris sont euthanasiées par inhalation de CO₂ et les tumeurs sous-cutanées ont été excisées. Une tumeur par souris a été remise en culture afin d'établir une sous-lignée. Une tumeur est gardée dans du RNA later (Quiagen,, Mississauga, ONT, CAN) pour des analyses génétiques ultérieures et finalement, une tumeur est envoyée au département de pathologie du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke à des fins d'analyses histologiques.

La deuxième méthode d'évaluation de la croissance *in vivo* consiste en une injection intrapéritonéal de 16 millions de cellules cancéreuses dans des souris SCID (n = 7) âgées de 6 à 8 semaines. Les injections ont été effectuées sous anesthésie générale induite par l'injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine/xylazine. Toutes les souris ont été observées à toutes les semaines jusqu'à ce qu'elles meurent de façon naturelle. Le jour de leur mort, les souris sont disséquées afin d'analyser la distribution des différentes tumeurs secondaires et afin de récolter l'ascite (s'il y a lieu). Une tumeur ainsi que l'ascite ont été remis en culture afin d'établir une sous-lignée. De plus, certaines tumeurs ont été envoyées au département de pathologie à des fins d'analyses histologiques.

Toutes les tumeurs envoyées au département de pathologie ont été mises dans un bloc de paraffine et des coupes histologiques de 3 microns d'épaisseur ont été faites. Une coloration différentielle à l'hémaroxyline et à l'éosine a été effectuée sur chaque échantillon analysé. Les coupes histologiques des tumeurs provenant des cellules cancéreuses injectées dans les souris ont été comparées aux coupes histologiques des tumeurs primaires des patientes.

5. Résultats

5.1. Caractéristiques morphologiques des lignées cellulaires

La cytomorphologie des deux nouvelles lignées cellulaires est présentée dans le tableau 5. La lignée OVC-116-A (figure 8-A) consiste en de petites cellules hétérogènes présentant des bordures cellulaires distinctes. Le noyau ces cellules est oval et habituellement au centre de la cellule. Ce noyau peut être qualifié de volumineux comparativement au cytoplasme. Le ratio N/C est évalué à 2 : 1 pour cette lignée cellulaire. Aucune vacuole n'est présente dans le cytoplasme des cellules OVC-116-A. Les cellules COV-2 (figure 8-B) quant à elle, sont beaucoup plus grosses que les OVC-116-A et contrairement à celles-ci, les cellules COV-2 ne présentent pas de bordures distinctes. Ce type cellulaire montre aussi que la localisation du noyau se situe au centre de la cellule, à l'intérieur d'un cytoplasme de grandeur moyen contenant des vacuoles. Le ratio N/C de la lignée COV-2 est évaluée à 3 : 1. La figure 8 montre la morphologie microscopique des deux nouvelles lignées de cancer ovarien analysée à l'aide d'un microscope optique et d'un microscope électronique à balayage. Les cellules OVC-116-A (figure 8-C) montrent la présence de lamellipodes et de microvillosités à leur surface. La figure 8-D, quant à elle, illustre la spécialisation de surface retrouvée sur la cellule COV-2. Celle-ci montre la présence de lamellipodes, de quelque microvillosités ainsi que la présence de sacs zéiotiques.

Tableau 5

Caractéristiques morphologiques des lignées cellulaires de cancer ovarien

Caractéristiques cellulaires		OVC-116-A	COV-2
<i>Cellule</i>			
	Grosueur	Petite	Moyenne
	Forme	Hétérogène	Hétérogène
	Bordure	Distinctes	Indistinctes
<i>Noyau</i>			
	nombre	Simple	Simple
	Forme	Ovale	Rond
	localisation	Centrale	Centrale
	Nucléole	Nombreux	Nombreux
<i>Cytoplasme</i>			
	Grosueur	Petit	Moyen
	Vacuoles	-	+
<i>Ratio N/C^a</i>		2:1	3:1

^a N/C = ratio Noyau/Cytoplasme

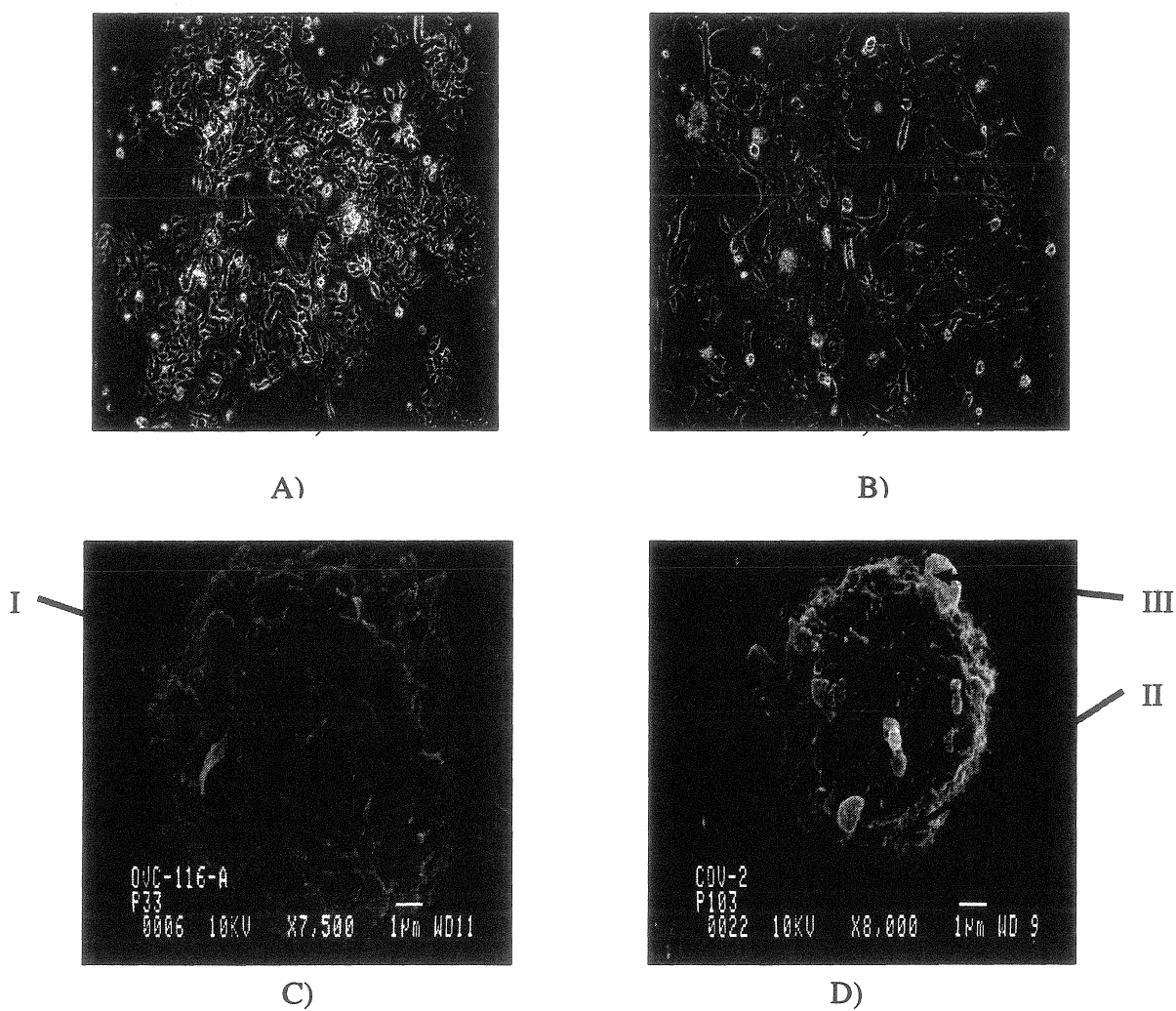


Figure 8 : Morphologie microscopique de OVC-116-A et de COV-2. A) : microscopie optique de OVC-116- A. B) : microscopie optique de COV-2. C) : microscopie électronique de OVC-116-A. D) : microscopie électronique de COV-2 Structure I) lamellipodes, II) microvillosités, III) sacs zéotiques

5.2. Expression de marqueurs cellulaires spécifiques

Le tableau 6 montre la sécrétion de marqueurs tumoraux des nouvelles lignées de cancer ovarien comparativement aux propriétés d'une lignée cellulaire humaine bien connue et établie de cancer ovarien, (ATCC) OVCAR-3. Les marqueurs CA125, ACE ainsi que CA15.3, des marqueurs normalement retrouvés chez les patientes atteintes de cancer ovarien, ont été analysés dans le milieu conditionné de chaque lignée cellulaire ainsi que dans le milieu de culture complet non conditionné des lignées cellulaires utilisées. Selon les analyses faites par le Laboratoire de Biochimie Clinique du Centre Hospitalier Universitaires de Sherbrooke, les lignées cellulaires OVC-116-A et COV-2 ne semblent pas sécréter aucun de ces marqueurs. Le milieu de culture conditionné de la lignée de cancer ovarien OVCAR-3 a été utilisée dans cette expérience comme contrôle positif de sécrétion.

Tableau 6

Propriétés de sécrétion d'antigènes tumoraux des lignées de cancer ovarien

	CA125 ^a	ACE	CA15.3 ^a
OVC-116-A	< 2 U/ml	< 4 U/ml	< 0,5 U/ml
COV-2	< 2 U/ml	< 4 U/ml	< 0,5 U/ml
OVCAR-3	383 U/ml	< 4 U/ml	< 0,5 U/ml

a) Le nombre d'unité est exprimé en terme d'unité par million de cellules. Les limites de détection inférieures des marqueurs sont fixées à 2 U/ml pour CA125, 4 U/ml pour ACE et 0,5 U/ml pour CA15.3

Le tableau 7 et les figures 9 et 10 résument l'expression de différents marqueurs caractéristiques des nouvelles lignées de cancer ovarien. Ces derniers ont été analysés soit par immunobuvardage de type Western ou par immunofluorescence indirecte sur lame. Le statut de chaque marqueur a été comparé à la lignée OVCAR-3, à la lignée SKOV-3 ip1 et à une culture primaire de cellules provenant d'une surface épithéliale ovarienne humaine, OVN-13-T. Les cellules OVC-116-A et COV-2 semblent exprimer plus de EGFR que les cellules OVCAR-3 et OVN-13-T mais beaucoup moins que la lignée cellulaire SKOV-3 ip1 qui montre d'ailleurs deux bandes de EGFR, une exprimant le EGFR activé (celle du haut) et l'autre, du EGFR non activé (celle du bas). Ce doublet d'expression montre la présence de EGFR activé de façon constitutive dans cette lignée cellulaire. De façon plus caractéristique, les cellules OVC-116-A montrent une plus grande expression de ErbB2 que les autres lignées analysées. Au niveau de l'expression des molécules d'adhésions, les cellules OVC-116-A n'expriment aucune cadhérine connue pour être exprimée spécifiquement dans le cancer ovarien (E-cadhérine, P-cadhérine) tandis que les cellules COV-2 semblent exprimer très peu de E-cadhérine et aucune P-cadhérine. Les deux lignées expriment un niveau semblable de N-cadhérine. L'expression de récepteur d'œstrogène ne semble pas varier comparativement à la lignée OVN-13-T. Le marqueur de progression CA125 a aussi été évalué et aucune détection de la protéine a été observée dans les cellules OVC-116-A aussi bien que dans les cellules COV-2.

Tableau 7

Marqueurs cellulaires spécifiques exprimés par les lignées de cancer ovarien

Marqueurs	OVC-116-A	COV-2
EGFR	+	+
ErbB2	+++	+
N-cadhérine	+	+
E-cadhérine	-	±
P-cadhérine	-	-
Récepteur d'estrogène	+	+
Cytokératine 8	+	+
Cytokératine 18	+	++
MUC1	+	+
Antigène épithélial humain	+	+
CA125	-	-

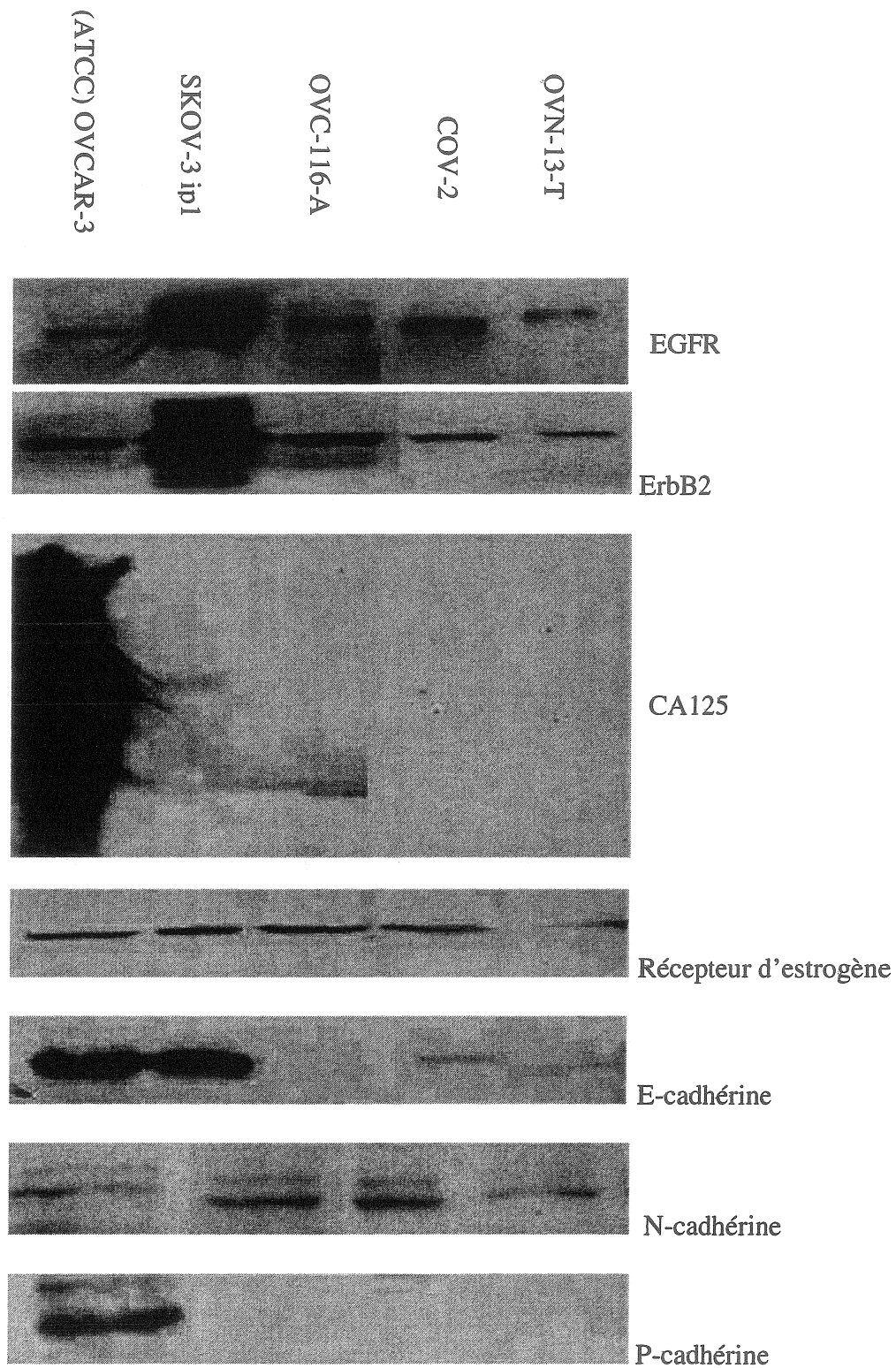
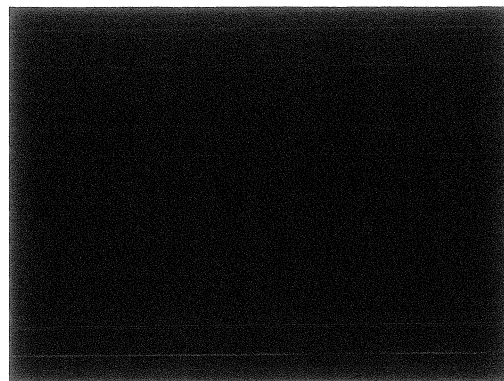


Figure 9 : Expression de différents marqueurs cellulaires par immunobuvardage de type Western dans des nouvelles lignées de cancer ovarien.

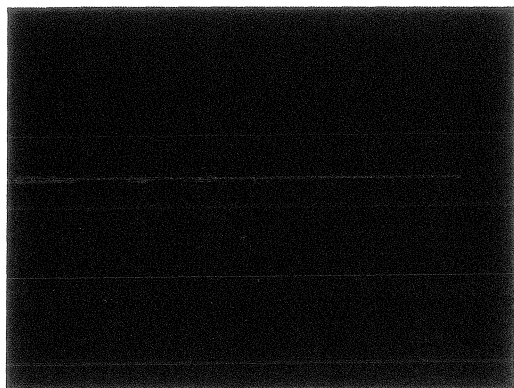
Par immunofluorescence indirecte sur lame, quatre marqueurs ont été visualisés. MUC-1 (figure 10-A et 10-B) semble être présent dans le cytoplasme des nouvelles lignées OVC-116-A et COV-2. MUC-1 est une mucine normalement retrouvée au niveau de la membrane cellulaire. La présence d'antigène de membrane épithéliale Ber-Ep4 (figure 10-C et 10-D) ainsi que des cytokératines 8 et 18 (figure 10-E et 10-F) ont aussi été observé dans les deux lignées cellulaires confirmant que les deux nouvelles lignées sont de nature épithéliale. Étant donné qu'aucune expression du marqueurs CA125 a été observée par immunobuvardage de type Western, celui-ci a été alors évalué par immunofluorescence sur des cellules ayant formées des sphéroïdes et une fois de plus, comparativement à la lignée OVCAR-3 qui montre une forte expression de CA125 à l'extérieur du sphéroïde, les nouvelles lignées OVC-116-A et COV-2 ne semblent pas exprimer la protéine CA125 (figure 11). Pour ce test, le modèle de croissance en sphéroïde a été privilégié car les tests préliminaires de détection de CA125 sur ces cellules croissant en monocouche n'avait montré aucun résultat positif. La croissance en sphéroïde aurait peut-être pu forcer l'expression de la protéine CA125 dans ces cellules ce qui ne s'est pas réalisé.



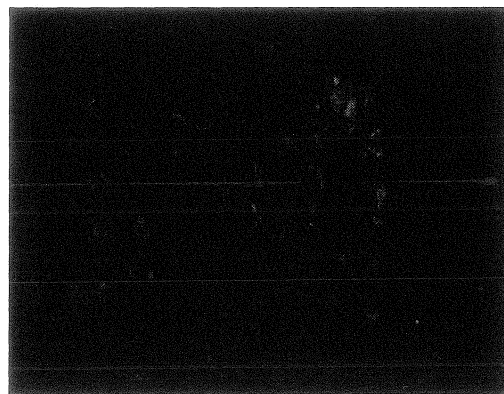
A)



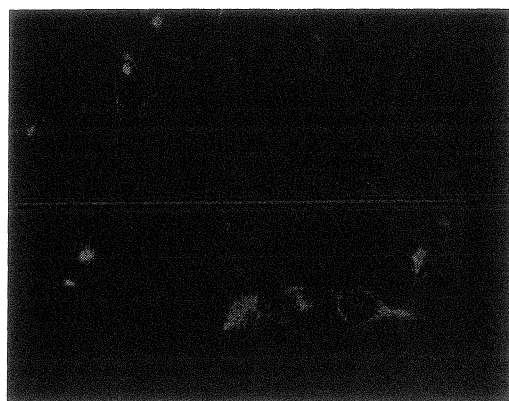
B)



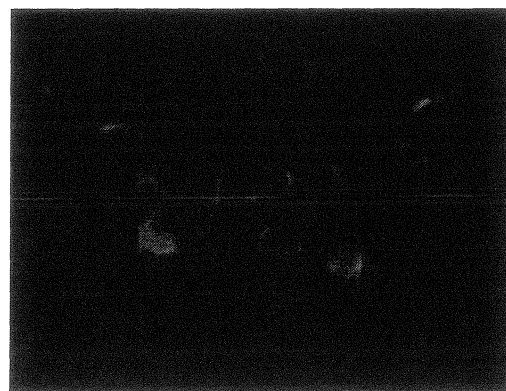
C)



D)

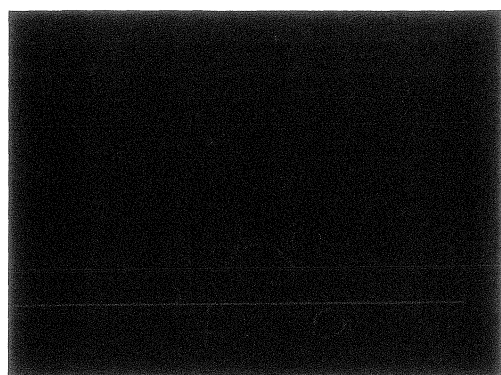


E)

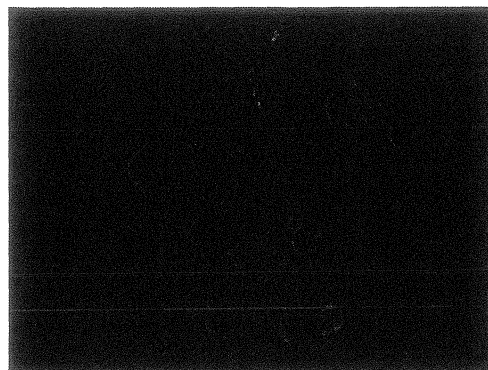


F)

Figure 10: Visualisation de différents marqueurs cellulaires par immunofluorescence indirecte sur lame. Figure A et B : MUC-1 (A : COV-2, B : OVC-116-A), figure C et D : antigène de membrane épithéliale (C : COV-2, D : OVC-116-A), figure E et F : cytokératines 8 et 18 (E : COV-2, F : OVC-116-A)



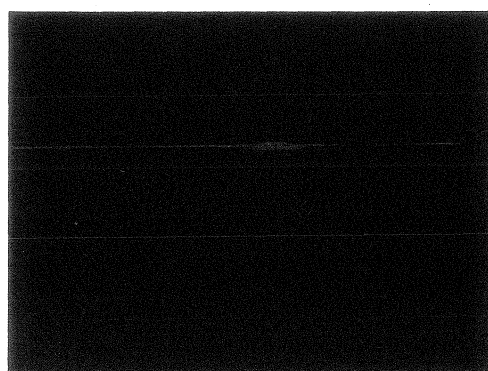
A)



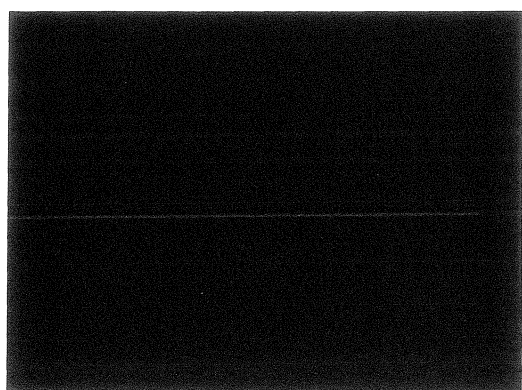
B)



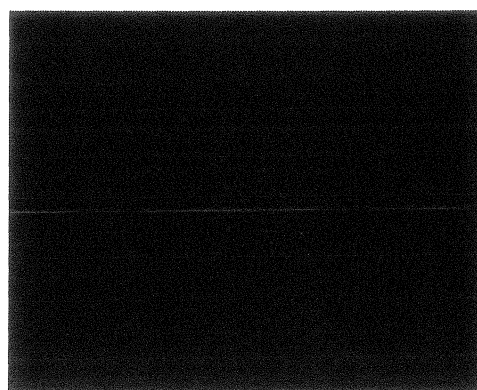
C)



D)



E)



F)

Figure 11: Visualisation du marqueur CA125 sur des sphéroïdes par immnufluorescence indirecte sur lame. Figure 11-A et B : CA125 sur des sphéroïdes de OVCAR-3 (fluorescence (A) et superposition sur l'image en visible (B)). Figure 11-C et D : CA125 sur des sphéroïdes de COV-2 (fluorescence (C) et superposition sur l'image en visible (D)). Figure 11-E et F : CA125 sur des sphéroïdes de OVC-116-A (fluorescence (E) et superposition sur l'image en visible (F)).

5.3. Caractéristiques moléculaires et caryotypes des nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien

Le tableau 8 résume certaines caractéristiques moléculaires tels que des mutations dans les gènes TP53, BRCA1, BRCA2 et KRAS, des gènes dont l'importance a été démontrée dans l'étiologie des cancers ovariens, et le caryotype des nouvelles lignées cellulaires. En analysant le génome des deux lignées cellulaires à l'aide de la technique SSCP, une mutation dans l'exon 7 du gène TP53 a pu être détectée chez la lignée OVC-116-A. Cette mutation consiste en une mutation homozygote à l'acide aminé 248 (nucléotide 14069) qui change le codon CGG (Arg) en TGG (Trp). Pour la lignée COV-2, une mutation de l'acide aminé 306 (nucléotide 14585 de la séquence GeneBank X54156) du codon 8 a été déterminée. Celle-ci consiste aussi en une mutation homozygote d'un CGA (Arg) en un TGA (codon d'arrêt). Par la même technique, la présence de mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 a été analysées pour les mutations les plus communes chez la population canadienne française (TONIN et al., 1998, TONIN et al., 2001). Pour les deux lignées, les analyses n'ont montré aucune mutation. Le gène KRAS a aussi été analysé par SSCP. La lignée COV-2 n'a montré aucune mutation dans ce gène tandis que la lignée OVC-116-A a une mutation hétérozygote dans le codon 13 changeant un GGC (Gly) en TGC (Cys). Les mutations dans le codon 13 du gène KRAS sont des événements beaucoup plus rares que des mutations dans le codon 12 de ce même gène.

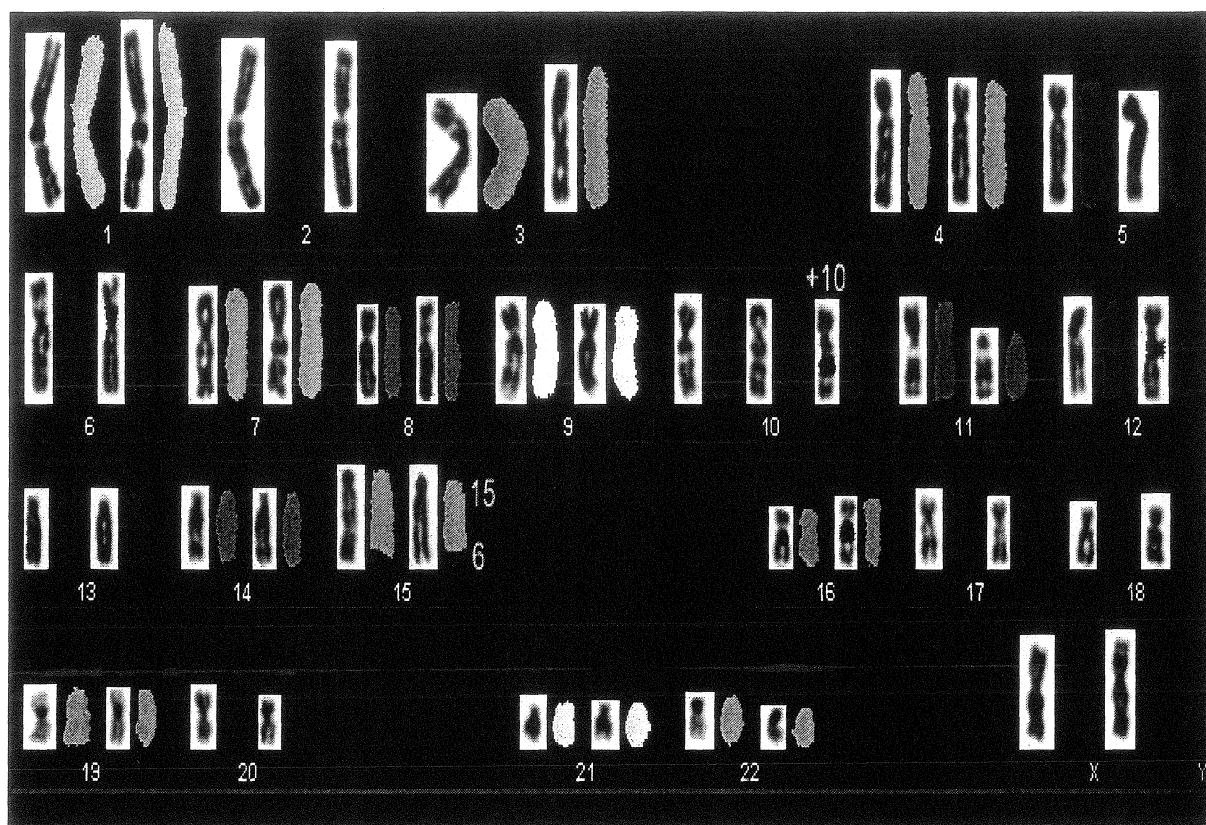
Le caryotype de chaque lignée a été fait en utilisant la technique de caryotype spectrale. La figure 12 expose le caryotype de la lignée OVC-116-A. Ce caryotype est principalement caractérisé par une trisomie du chromosome 10 ainsi qu'une translocation entre le chromosome 6 et le chromosome 15. Le caryotype complexe de la lignée COV-2 (figure 12) montre, quant à lui, la présence de plusieurs translocations et plusieurs chromosomes sont en multiples copies suggérant et reflétant la complexité génétique des cancers ovariens.

Tableau 8

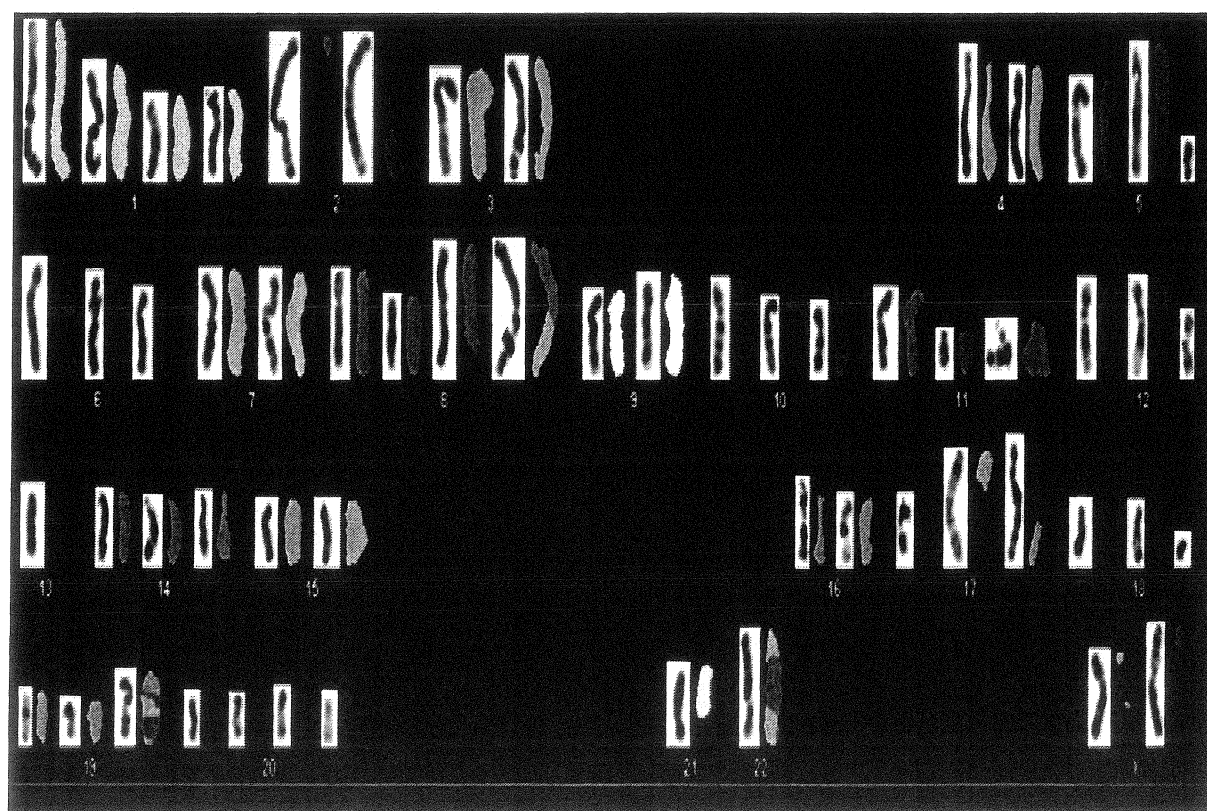
Caractéristiques moléculaires et caryotypes des lignées cellulaires de cancer ovarien

Lignée	mutations				Caryotype
	TP53	BRCA1	BRCA2	KRAS	
OVC-116-A	Exon 7	WT	WT	Codon 13	47, XX, +10,der(15),dup(15)(q24-qter), t(6;15)(?;qter)
COV-2	Exon 8	WT	WT	WT	52-59, der(2)t(2;12)(q35;q?24), der(8)t(8;13)(pter;q?) der(16)t(16;17)(p12;?) der(22)(2?-2?::11q13?-11q21?::22pter-22qter

Figure 12: Caryotype déterminé par la méthode SKY des nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien. A) Caryotype simple des cellules OVC-116-A (p36), B) Caryotype complexe des cellules COV-2 (p110)



A)



B)

5.4. Paramètres de croissance des nouvelles lignées cellulaires

Le temps de génération (figure 13) et le pourcentage d'efficacité clonogénique en condition adhérente et non-adhérente sont résumés dans le tableau 9. Pour chaque lignée cellulaire, le temps de génération est évalué dans la phase exponentielle de leur courbe de croissance respective. Les temps de génération pour les deux lignées cellulaires se situe entre 25 et 30 heures. Le pourcentage d'efficacité clonogénique a été évalué à basse densité cellulaire en condition adhérente (dans une plaque 6-puits) et en condition non-adhérente (dans l'agar mou). En condition adhérente, les deux lignées cellulaires ont formé des colonies avec des pourcentages d'efficacité clonogéniques similaires. En condition non-adhérente, les deux lignées semblent avoir aussi le même pouvoir clonogénique.

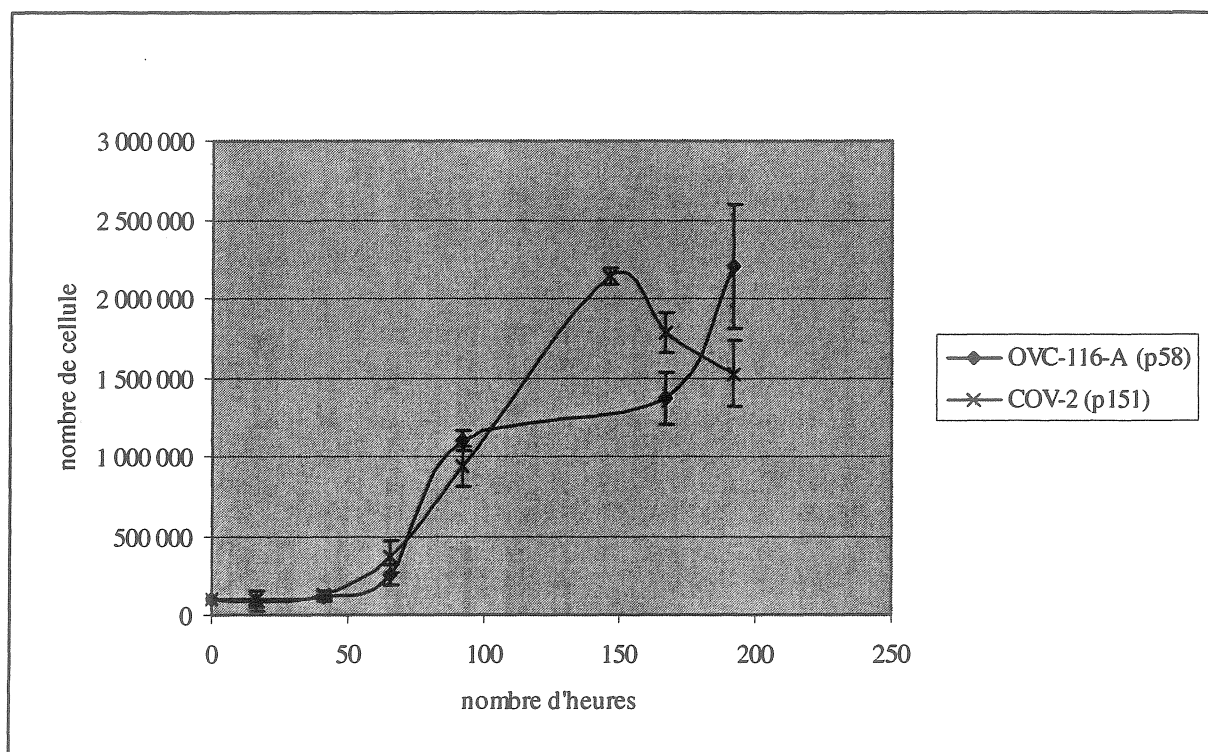


Figure 13 : Courbe de croissance de OVC-116-A et de COV-2

5.5. Croissance en sphéroïde

Chaque lignée cellulaire a été incubée sans adhésion pendant deux et six jours dans des pétris recouvert d'agar 1,2%. Après chaque temps d'incubation, les sphéroïdes ont été récoltés et colorés de façon différentielle avec la technique de coloration utilisant l'orangé d'acridine et l'iodure de propidium. Ce type de coloration colore les cellules selon le critère de l'intégrité membranaire. L'orangé d'acridine est une base faible qui entre rapidement dans les cellules vivantes et agit en tant que colorant d'inclusion. Il colore les cellules vivantes en vert. L'iodure de propidium est un colorant d'exclusion qui ne peut pas pénétrer dans les cellules vivantes. Quand il pénètre à l'intérieur d'une cellule morte, il se lie à l'ADN de la cellule et permet sa visualisation en colorant la cellule en rouge. Les sphéroïdes formés après deux et six jours ont été analysés. Les lignées OVC-116-A et COV-2 forment des sphéroïdes après deux jours d'incubation et après six jours d'incubation et ces sphéroïdes sont viables (figure 14) si on se fie à la coloration majoritairement verte des sphéroïdes. Les lignées cellulaires contrôles MESO-2 et OVN-13-T, quant à elles, ne semblent pas former de sphéroïde et les cellules restantes semblent être mortes car les cellules apparaissent jaune ou rouge. Au niveau de la grosseur des sphéroïdes, la lignée OVC-116-A semble former des sphéroïdes plus petits que ceux formés par lignée COV-2. Après deux jours d'incubation, les sphéroïdes sont 100% viables (tel que l'on peut observer de façon qualitative par la double coloration) cependant, après six jours d'incubation, certaines cellules dans les sphéroïdes COV-2 apparaissent rouge (donc mortes) ce qui n'est pas observée dans les sphéroïdes de OVC-116-A. Par contre, après deux jours d'incubation, les cellules OVC-116-A qui n'ont pas formé de sphéroïde et qui sont isolées en suspension ne semblent plus vivantes.

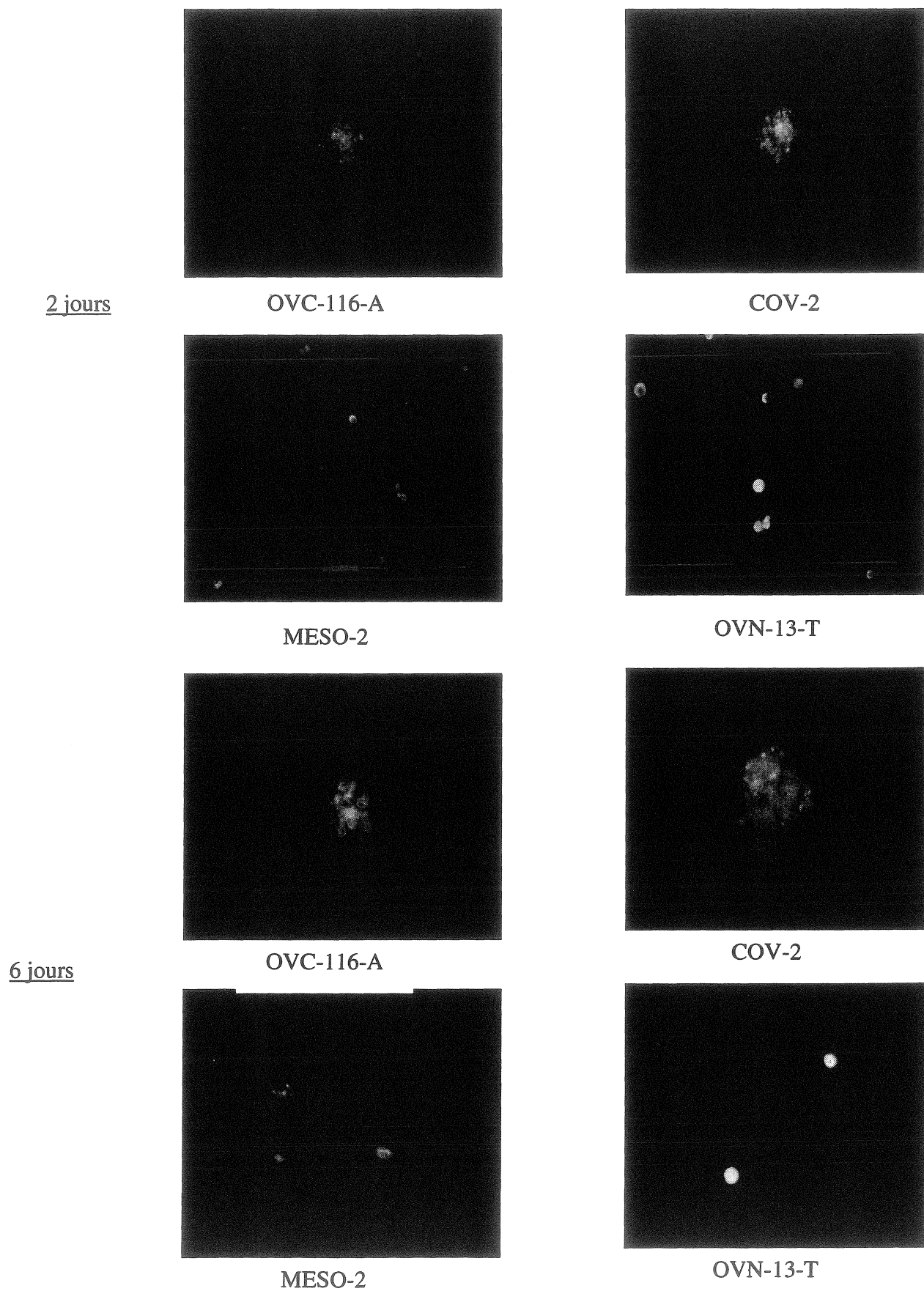


Figure 14 : Viabilité des sphéroïdes OVC-116-A et COV-2 après deux jours et 6 jours d'incubation.
Coloration verte : cellule vivante; coloration jaune ou rouge : cellule morte

Tableau 9

Résumé des paramètres de croissance des nouvelles lignées de cancer ovarien

Paramètres	OVC 116-A	COV-2
Temps de génération	27 h \pm 2 h	27 h \pm 3 h
Sphéroïdes	Oui	Oui
Efficacité clonogénique en adhésion	35 % \pm 1 %	28 % \pm 2 %
Efficacité clonogénique sans adhésion	13 % \pm 1 %	14 % \pm 2 %

5.5. Résistance à l'apoptose et à l'anoïkose

L'expression des protéines associées à l'apoptose Bcl-2, Bcl-X_L et Bax a été évaluée par immunobuvardage de type Western sur des échantillons provenant de culture en monocouche (figure 15). L'expression de ces protéines dans les nouvelles lignées cellulaires COV-2 et OVC-116-A a été comparée à celle retrouvée dans des cellules normales de la surface épithéliale ovarienne (OVN-13-T) et dans une lignée cellulaire bien connue et caractérisée ((ATCC) OVCAR-3). Les deux lignées expriment globalement plus de Bcl-X_L que la lignée OVN-13-T mais moins que la lignée (ATCC) OVCAR-3. La lignée OVC-116-A exprime un niveau plus élevé de Bcl-2 que toutes les autres lignées de cancer ovarien étudiées. La protéine Bax semble être exprimée à des niveaux similaires dans les lignées cellulaires de cancer ovarien tandis qu'elle semble être plus exprimée dans les cellules OVN-13-T.

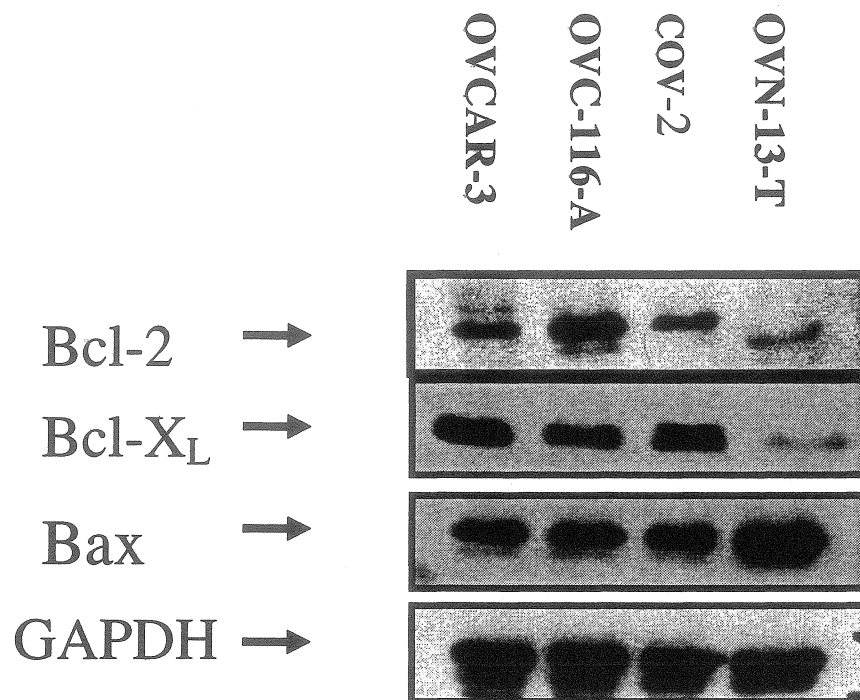


Figure 15 : Expression des protéines de la famille Bcl-2 dans les lignées de cancer ovarien

De plus, la sensibilité à l'anoïkose a été évaluée pour les nouvelles lignées de cancer ovarien par plusieurs méthodes. D'abord, des tests de viabilité cellulaire utilisant la propriété d'adhésion des cellules cancéreuses ont été effectués sur des cellules croissant en suspension sous forme sphéroïde (figure 16). Ce test de viabilité a montré que dans la lignée cellulaire COV-2, on pouvait observer une diminution du nombre de cellules adhérentes en fonction du temps d'incubation en suspension ce qui suggère qu'il y a présence de mortalité cellulaire dans les sphéroïdes de COV-2. Cependant, pour la lignée cellulaire OVC-116-A, le phénomène contraire (une augmentation du nombre de cellule adhérentes dans le temps) y est observé suggérant que les cellules OVC-116-A ne meurent pas lorsqu'elles sont en suspension.

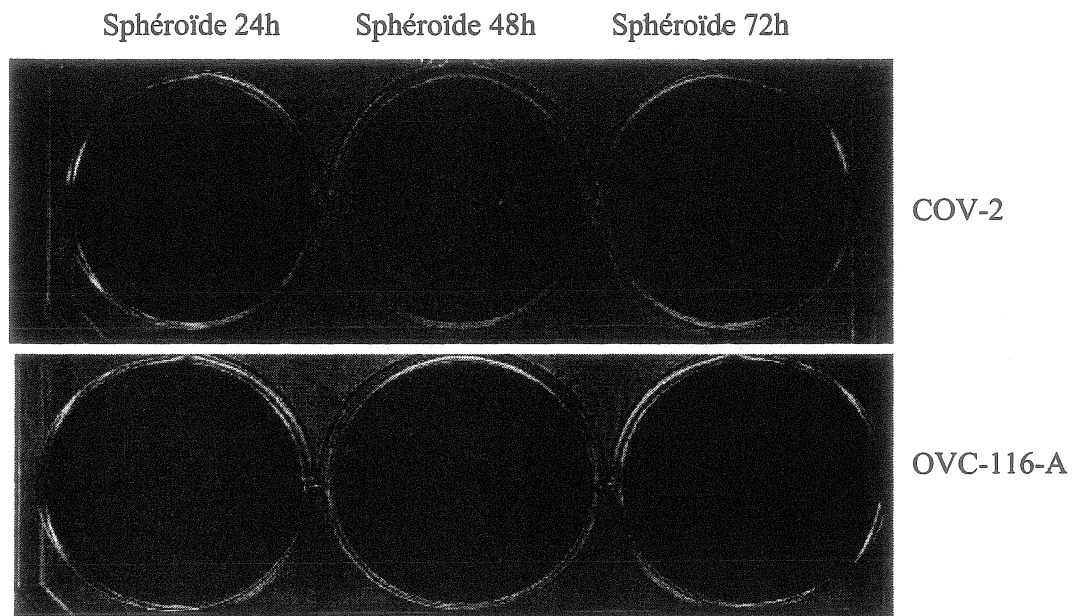


Figure 16 : Capacité d'adhésion des cellules croissant en sphéroïdes en fonction du temps

Une deuxième façon permettant de vérifier la viabilité des cellules croissant en sphéroïde est en visualisant la mortalité cellulaire par la technique d'incorporation de l'iodure de propidium dans les sphéroïdes (figure 17). Ce test a permis d'observer de la mortalité cellulaire (cellules rouges) dans les sphéroïdes provenant de la lignée COV-2 et ce, jusqu'à 72 heures d'incubation tandis que, pour la lignée cellulaire OVC-116-A, très peu de cellules mortes ont pu être observées dans les sphéroïdes.

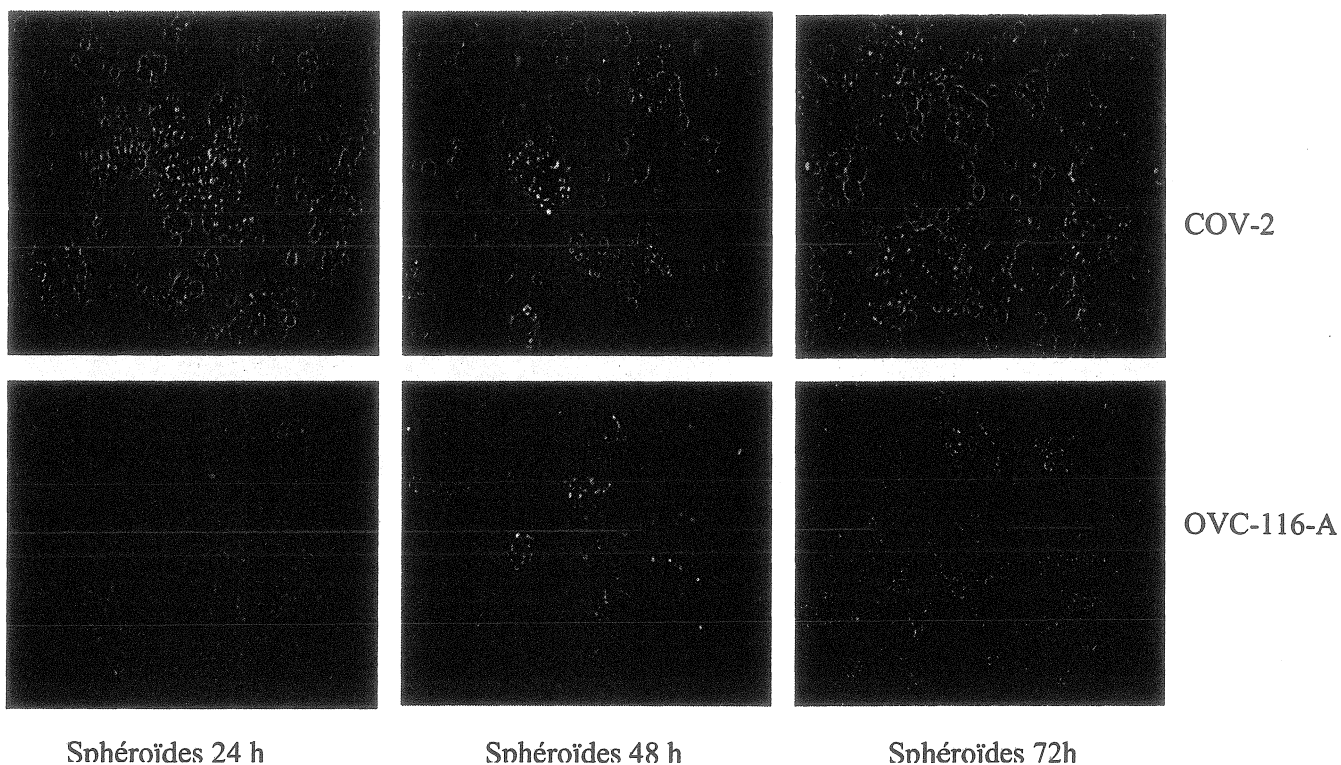


Figure 17 : Visualisation de la mortalité cellulaire en sphéroïde par la méthode d'incorporation de l'iodure de propidium.

La résistance à l'anoïkose des nouvelles lignées de cancer ovarien a aussi été évaluée par un test de croissance sans adhésion sur de l'hydrogel (figure 18). Pour chaque temps d'incubation choisi, un test de viabilité cellulaire basé sur la conversion du XTT est effectué. Les cellules OVC-116-A semblent ne pas être affectées par l'anoïkose tel que l'on peut constater dans la figure 18. Cette lignée semble même proliférer en suspension comme suggéré précédemment par le test de remise en culture de la figure 16. Par contre, la lignée COV-2 semble être affectée par l'anoïkose

très rapidement. Pour cette lignée, la viabilité passe de 90% après 24 heures d'incubation à 30% après 72 heures d'incubation.

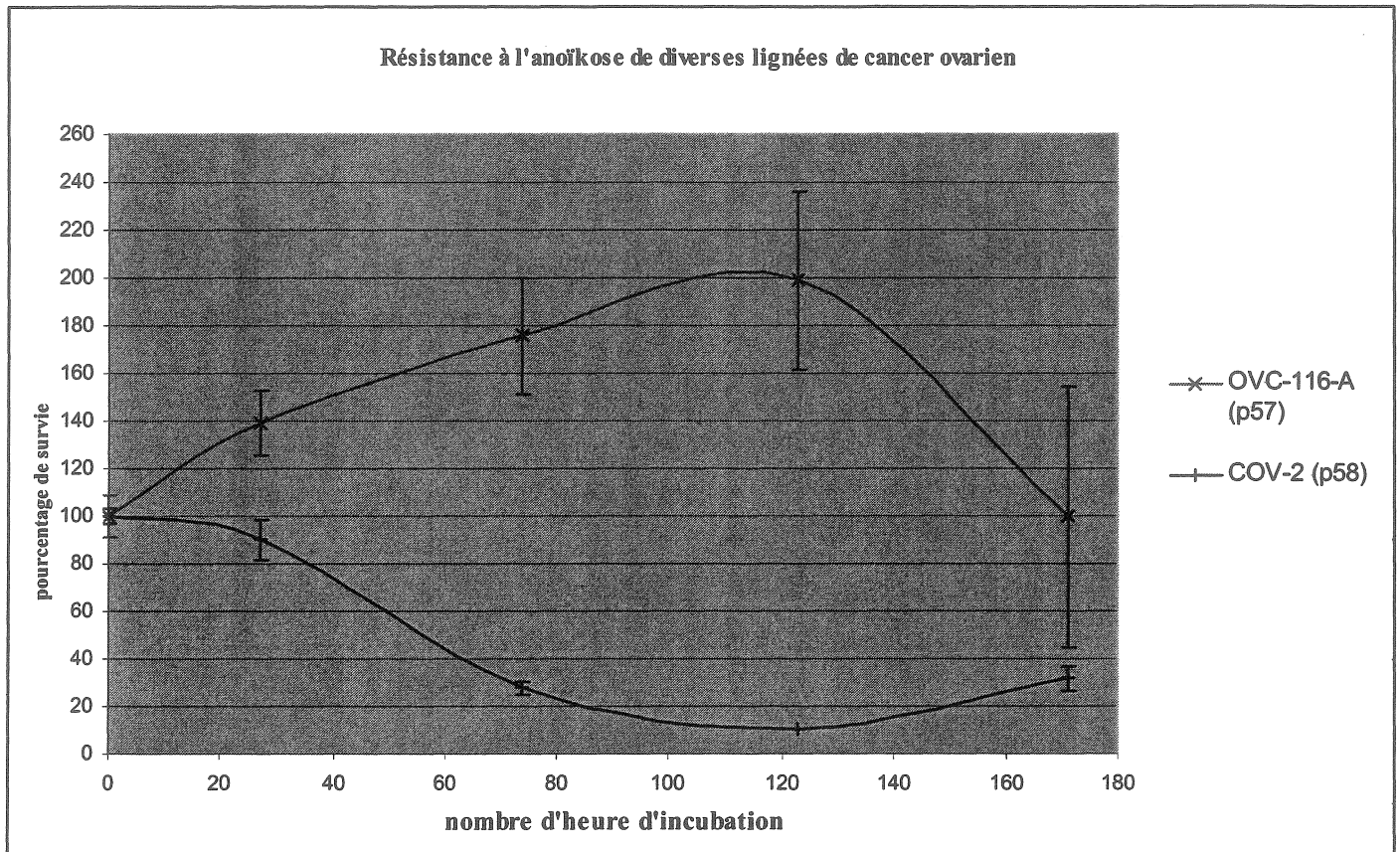


Figure 18 : Résistance à l'anoïkose des nouvelles lignées de cancer ovarien.

L'induction de l'anoïkose dans les sphéroïdes a aussi été évaluée par une mesure de l'apoptose à l'aide d'un test ÉLISA (figure 19). Ce test quantifie la quantité d'histone liée à de l'ADN dans le cytoplasme des cellules apoptotiques. Les résultats de cet ELISA ont montré que dans la lignée cellulaire OVC-116-A, il y a qu'une très faible induction d'anoïkose après 24 h de culture sans adhésion et aucune anoïkose après 48 heures d'incubation en suspension tandis-que pour la lignée cellulaire COV-2, après 24 heures d'incubation en suspension, il y a une induction d'anoïkose

d'environ 100 fois par rapport aux cultures en monocouche et que cet induction diminue d'un peu plus de la moitié après 48 heures d'incubation. Ces résultats suggèrent que OVC-116-A est résistante à l'anoïkose lorsque les cellules croissent en sphéroïde.

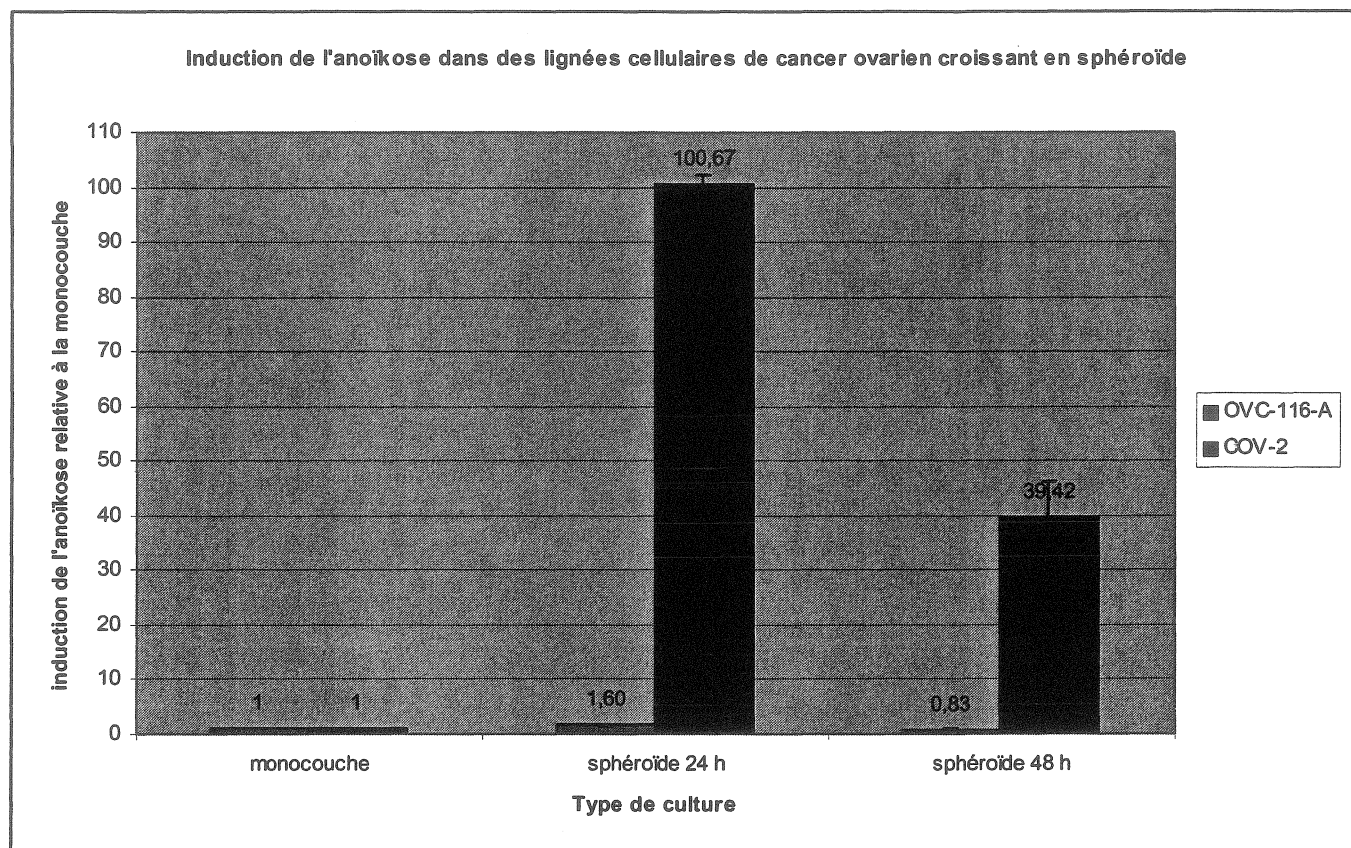


Figure 19 : Induction de l'anoïkose dans des lignées cellulaires de cancer ovarien croissant en sphéroïde

Finalement, l'induction de l'anoïkose dans les nouvelles lignées de cancer ovarien a été analysée de façon moléculaire via des immunobuvardages de type Western. Certaines protéines effectrices impliquées dans l'apoptose telles que la pro-caspase 9, la pro-caspase 3 et le PARP (substrat de la caspase 3) ont été analysées (figures 20 à 22). Il est à noter que les résultats montrés dans les figures suivantes (figures 20 à 25) sont des résultats préliminaires qui n'ont été qu'effectués qu'une fois. D'autres essais devront être faits pour répéter ces expériences. Pour les deux lignées

cellulaires, l'analyse de la disparition de la pro-caspase 9 (caspase initiateur) a montré que celle-ci ne semble être activée lorsque les cellules croissent en sphéroïdes (figure 20).

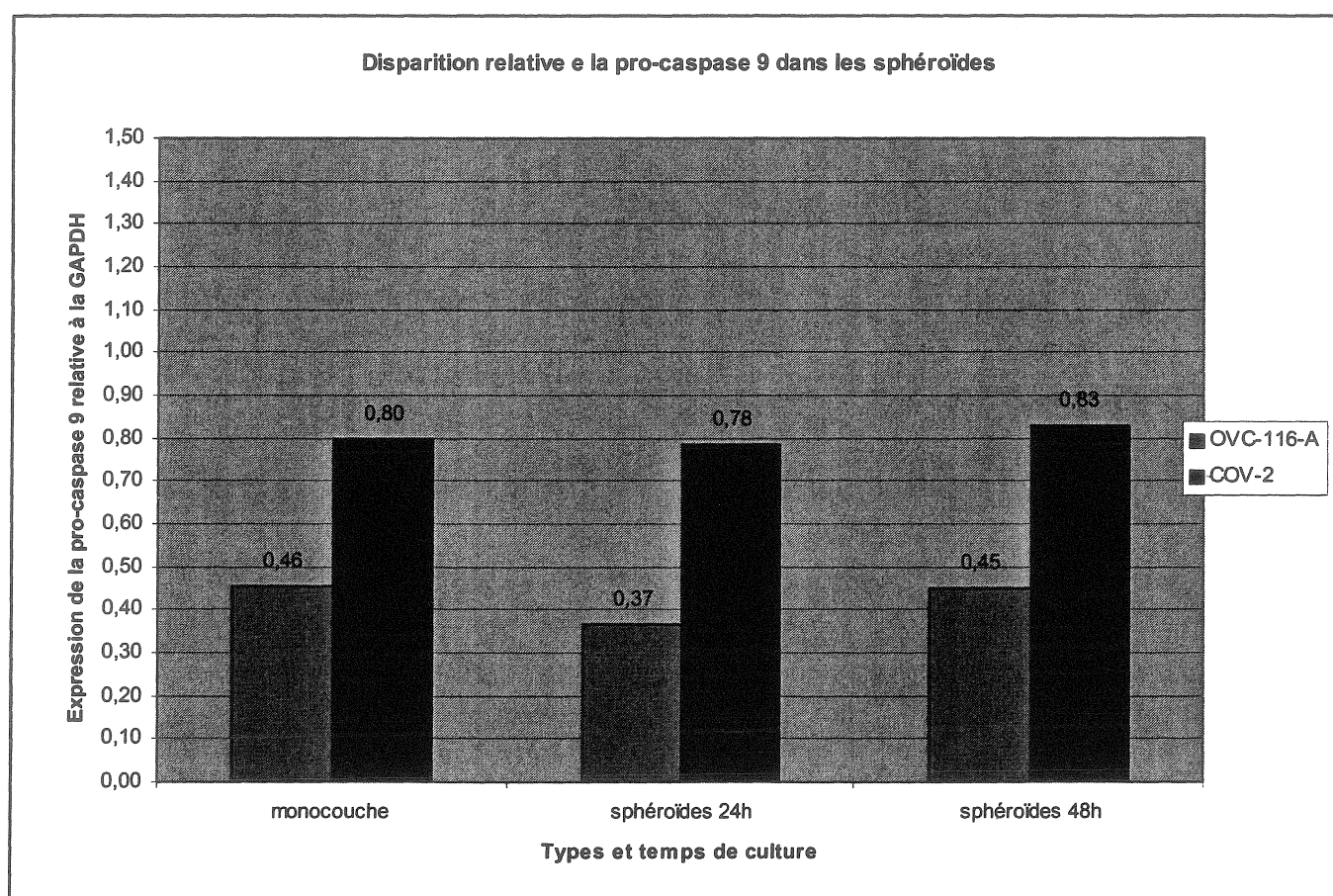
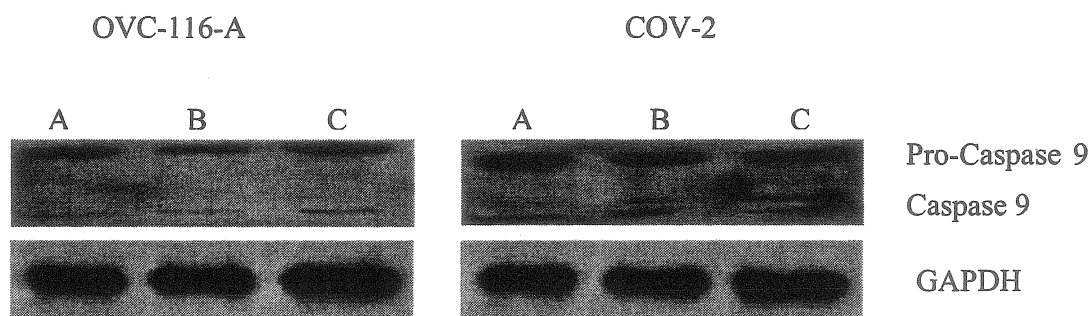


Figure 20 : Disparition de la pro-caspase 9 relative à la GAPDH dans les sphéroïdes, Légende : A) monocouche, B) sphéroïdes 24 h, C) sphéroïdes 48 h

Cependant, l'analyse de la disparition de la pro-caspase 3 a montré que celle-ci ne semble être activée dans la lignée cellulaire OVC-116-A. Cependant, dans la lignée cellulaire COV-2, on

peut constater une activation de la pro-caspase 3 lorsque les cellules sont en sphéroïdes permettant d'émettre l'hypothèse que cette protéine semble être impliquée dans l'induction de l'anoïkose (figure 21).

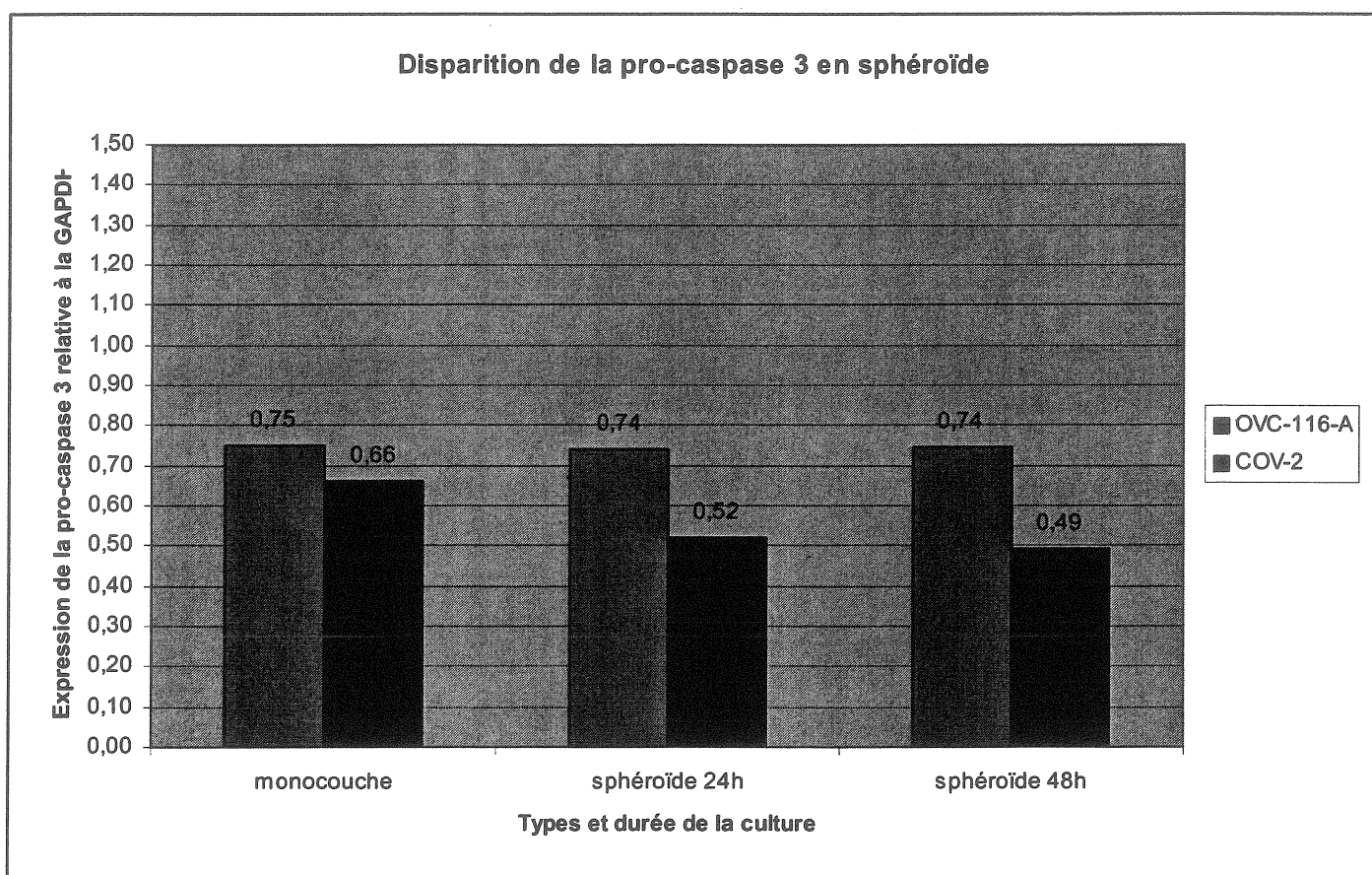
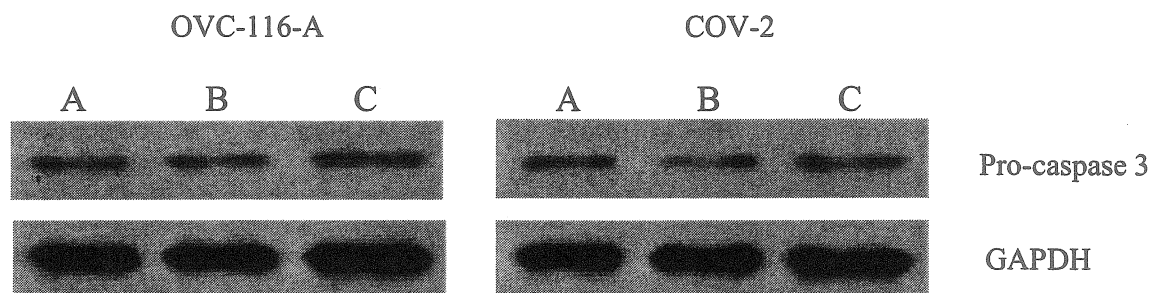
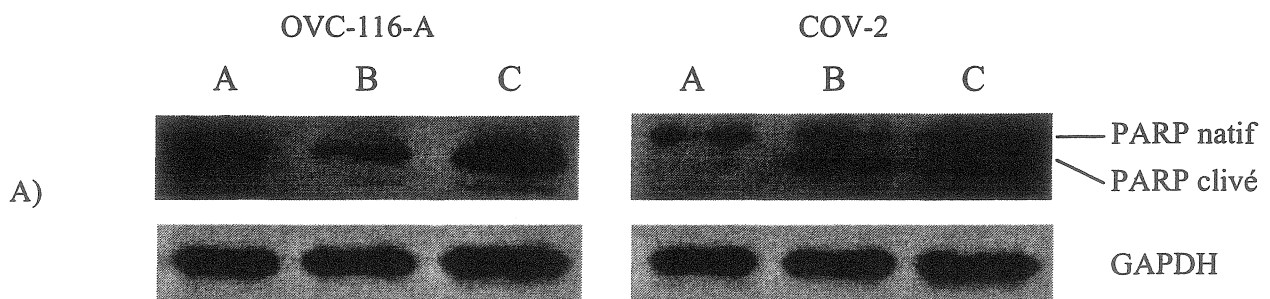


Figure 21 : Disparition relative de la pro-caspase 3 dans les sphéroïdes. Légende : A) monocouche, B) sphéroïdes 24 h, C) sphéroïdes 48 h

La protéine PARP, un substrat de la caspase 3, a aussi été analysée par immunobuvardage de type Western dans les deux lignées cellulaires (figure 22-A). Selon le patron des bandes obtenues, cette protéine ne serait pas clivée dans le cas de la lignée OVC-116-A permettant d'affirmer qu'aucune induction de l'anoïkose n'est observée dans cette lignée cellulaire. Cependant, on peut remarquer que lorsque la lignée cellulaire COV-2 croît en sphéroïde pendant 24 heures et 48 heures, il y a un clivage de la protéine PARP. Ce clivage semble être plus prononcé après 24 heures d'incubation qu'après 48 heures d'incubation en sphéroïde appuyant le résultats obtenus quant à l'induction de l'anoïkose par le test ELISA (voir figure19). Ce résultat corrèle avec la disparition de la pro-caspase 3 (donc, l'activation de la caspase 3 menant au clivage de son substrat PARP) lorsque les cellules COV-2 croissent en sphéroïdes. Pour les deux lignées cellulaires, lorsque l'on fait le ratio entre le PARP clivé normalisé avec la GAPDH et le PARP natif normalisé aussi avec la GAPDH pour chaque temps d'incubation, on remarque que ce ratio semble diminuer pour la lignée cellulaire OVC-116-A suggérant qu'il n'y a pas d'induction de l'anoïkose via l'activation de la caspase 3 dans cette lignée tandis que l'on peut observer une augmentation du ratio dans la lignée COV-2 suggérant donc une induction de l'anoïkose (figure 22-B).



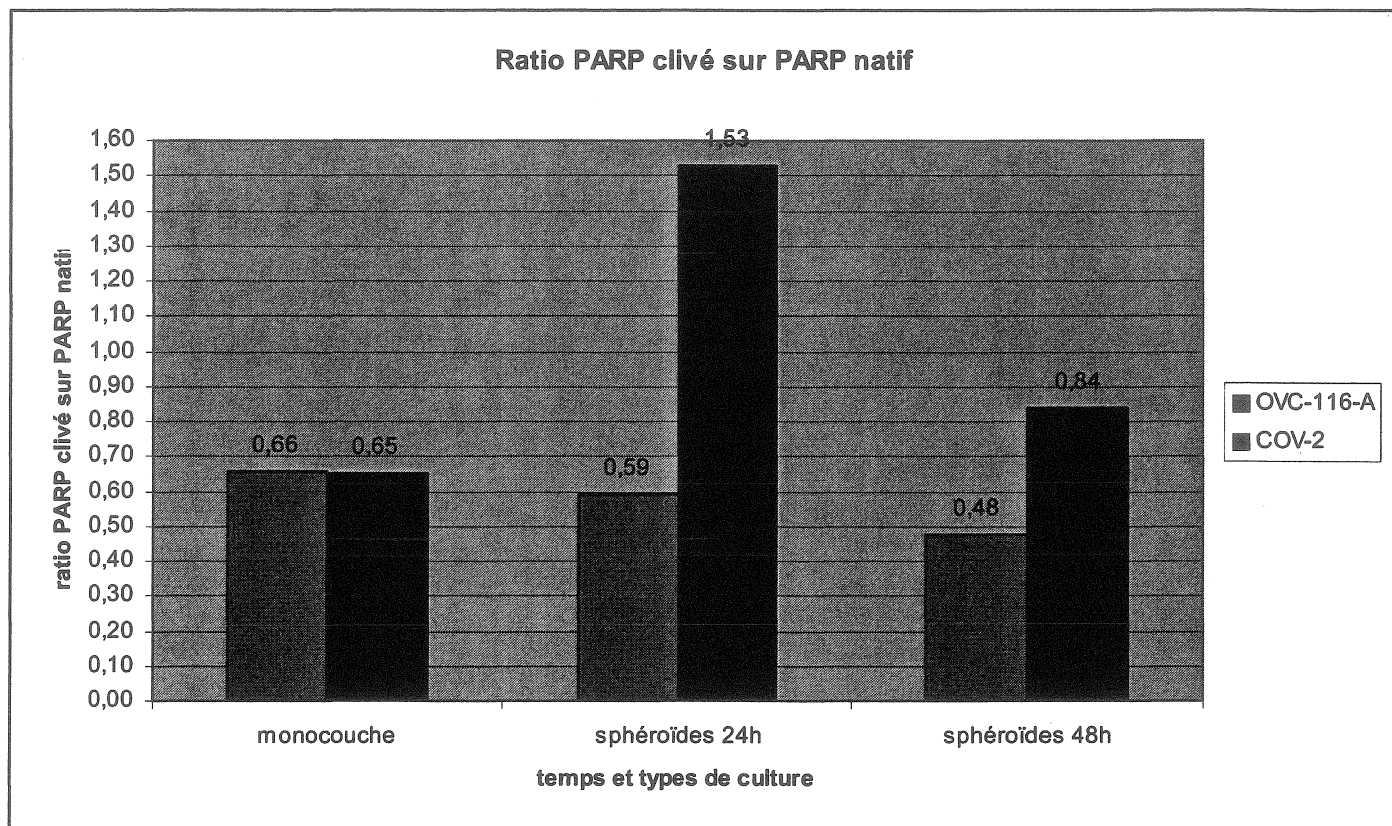


Figure 22 : Expression relative de PARP en sphéroïde. Fig. 22-A) Immunobuvardage de type Western contre PARP dans les lignées cellulaires de cancer ovarien. Légende : A) monocouche, B) sphéroïdes 24 h, C) sphéroïdes 48h. Fig. 22-B) Ratio du PARP clivé sur le PARP natif dans les lignées cellulaires croissant en sphéroïde.

Par la même technique, le statut des protéines de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2, Bcl-X_L et Bax a été analysé dans les deux nouvelles lignées cellulaires (figures 23 à 25). L'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est plus élevée dans la lignée OVC-116-A que dans la lignée cellulaire COV-2 (figure 23) tandis que l'expression de la protéine Bcl-X_L (figure 24) ne semble pas varier beaucoup d'une lignée à l'autre et d'un type de culture à l'autre (monocouche versus sphéroïde) laissant suggérer que cette protéine n'a peut-être pas un rôle déterminant dans la survie de ces cellules en sphéroïde.

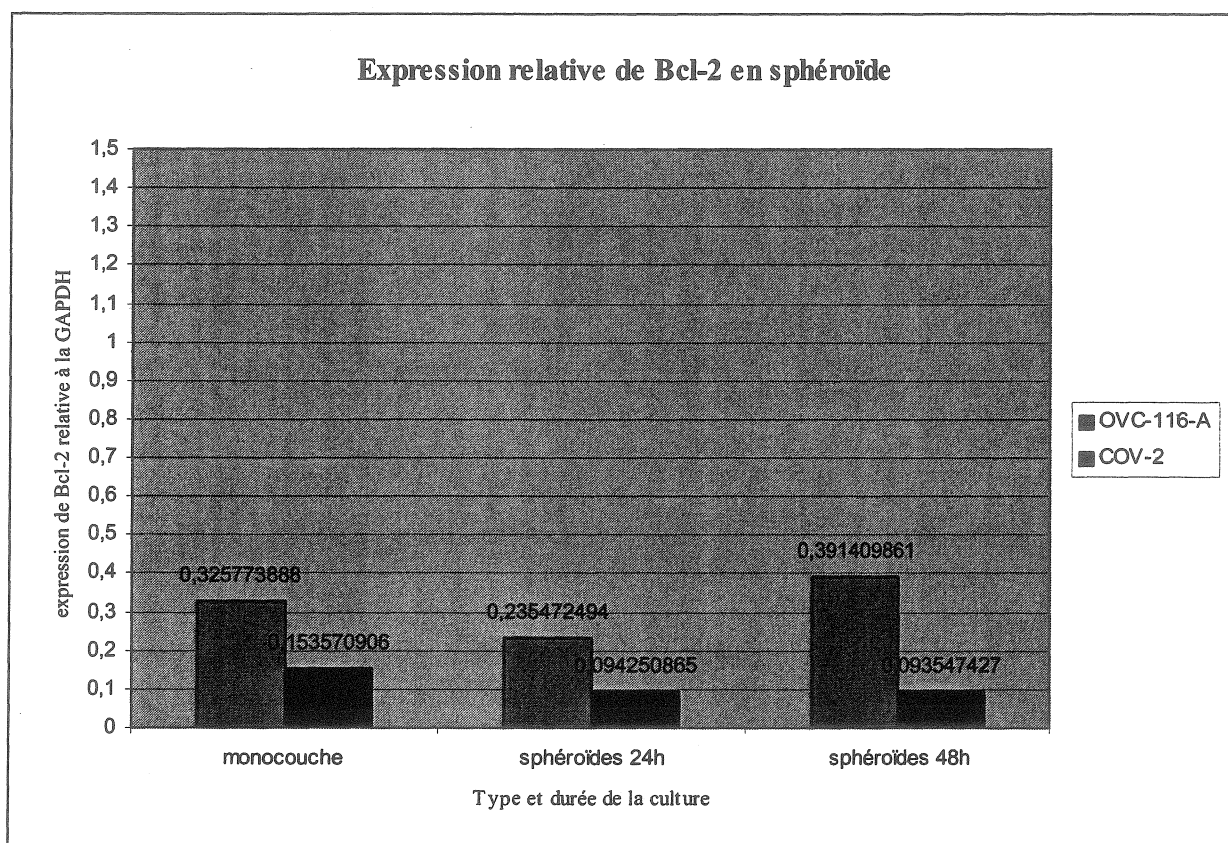
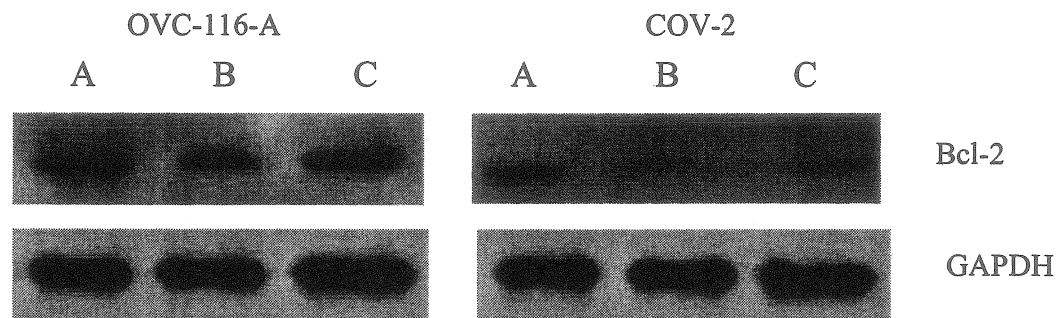


Figure 23 : Expression globale de Bcl-2 dans les sphéroïdes OVC-116-A et de COV-2 évaluée par immunobuvardage de type Western. Légende : A) monocouche, B) sphéroïdes 24h, C) sphéroïdes 48 h

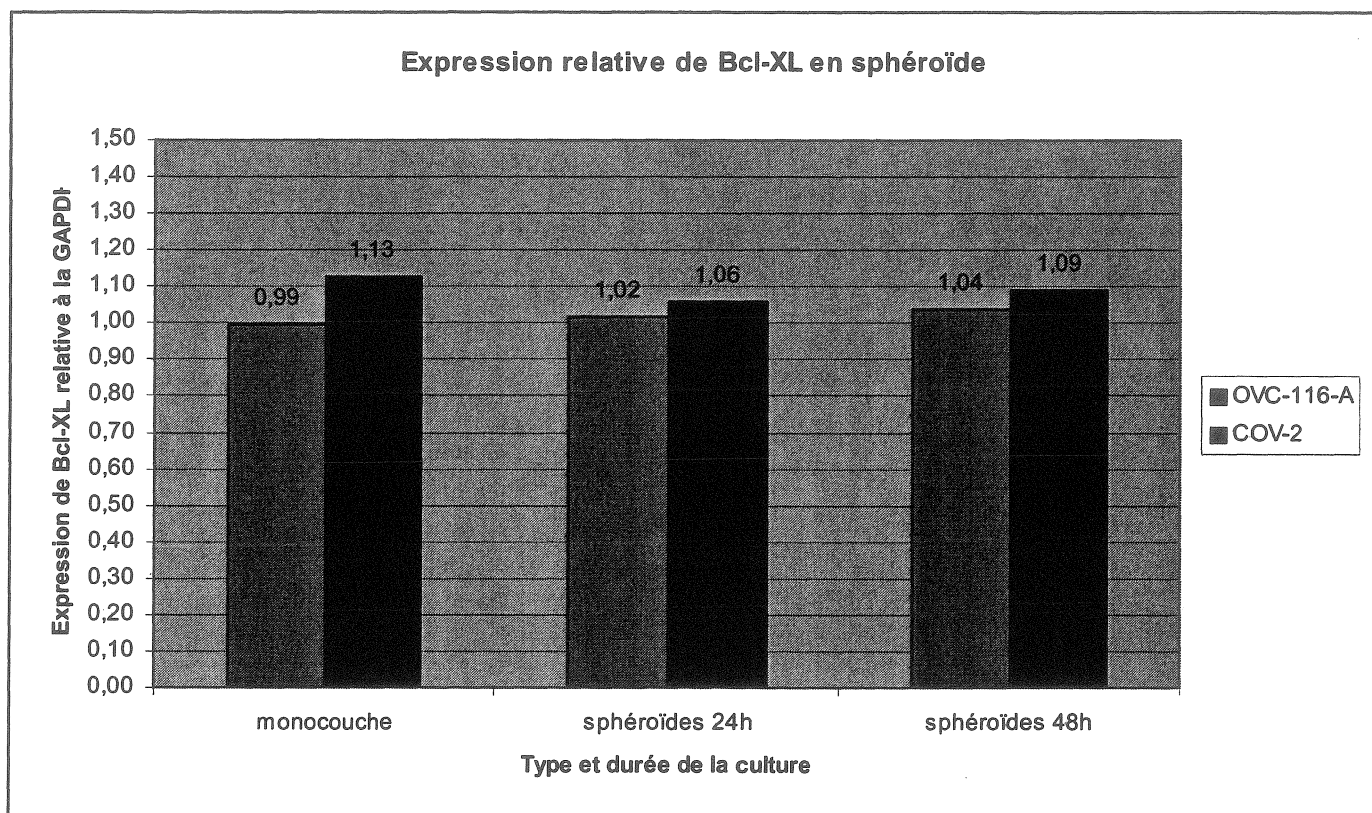
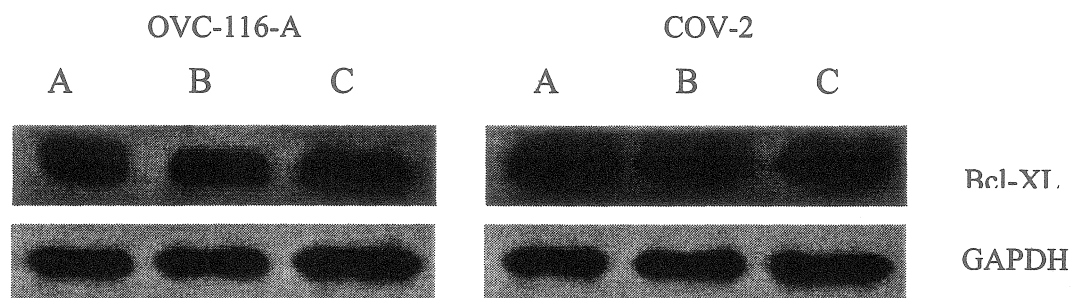


Figure 24 : Expression relative de Bcl-X_L dans les sphéroïdes. Légende : A) monocouche, B) sphéroïdes 24h, C) sphéroïdes 48h

L'expression de Bax, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, a aussi été évalué dans les sphéroïdes de OVC-116-A et de COV-2 (figure 25). Pour les deux lignées cellulaires, l'immunobuvardage de type Western a montré que l'expression de cette protéine semble être augmenter après 24 heures d'incubation en sphéroïdes. Cette augmentation semble être plus marquée pour la lignée COV-2 que pour la lignée OVC-116-A corrélant avec la grande induction de l'anoïkose à 24 heures observées dans la lignée COV-2 avec le test ELISA. L'expression

globale de Bax semble diminuer après 48 heures d'incubation en sphéroïde pour les deux lignées cellulaires.

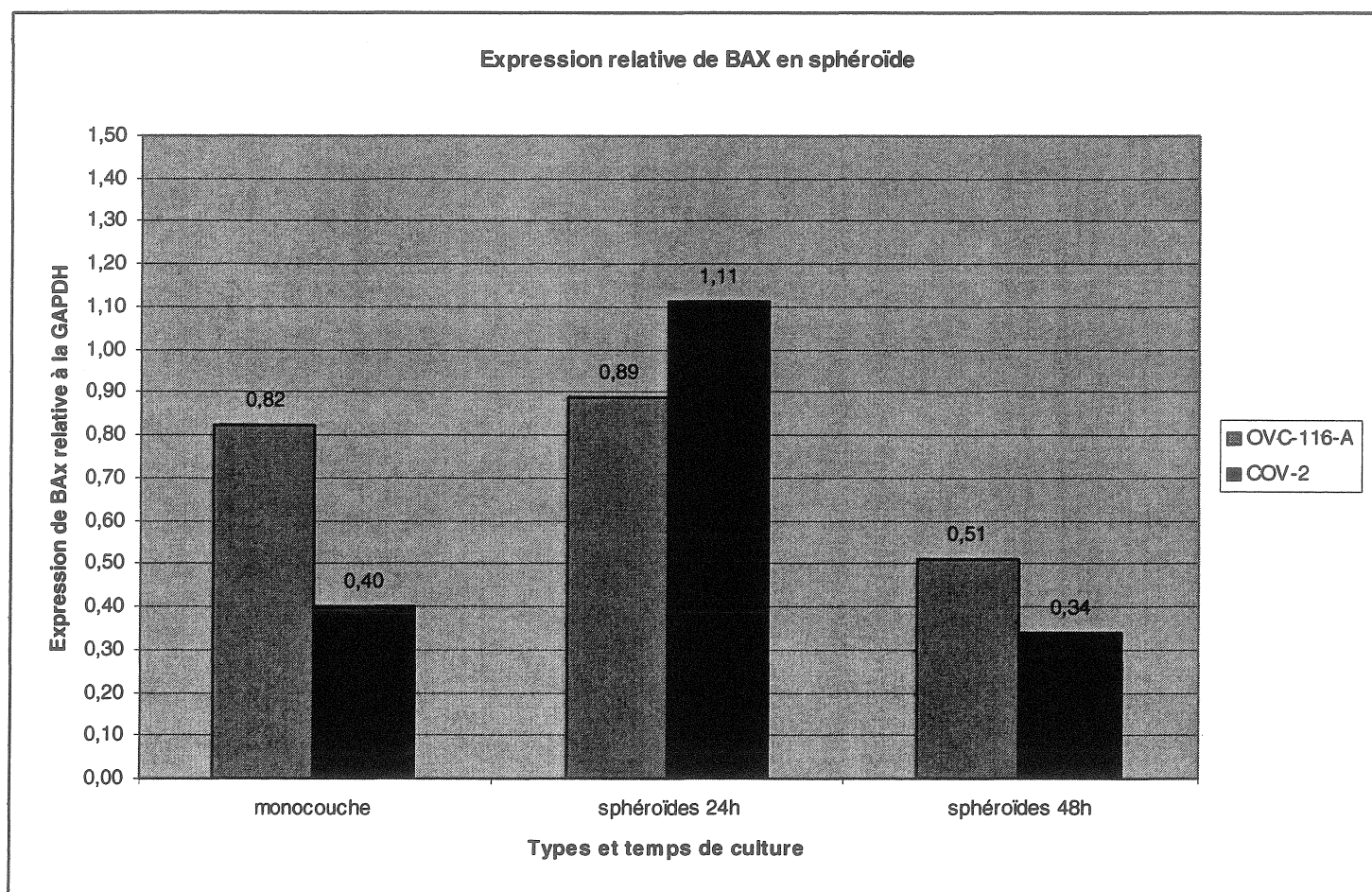
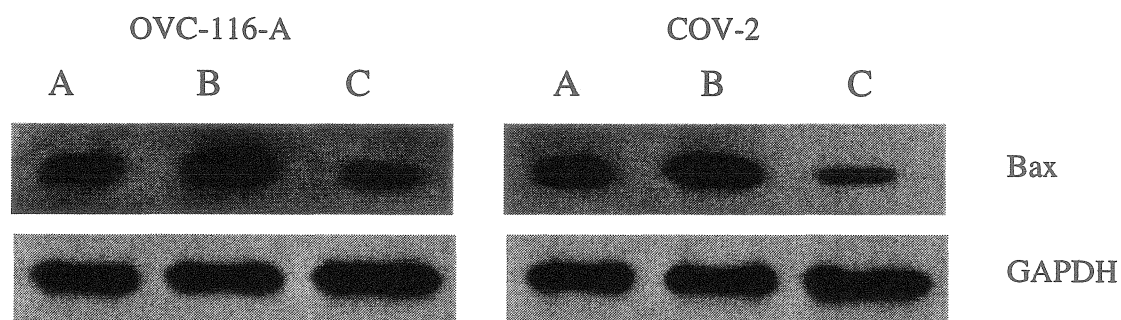


Figure 25 : Expression relative de Bax dans les sphéroïdes. Légende : A) monocouche, B) sphéroïdes 24 h, C) sphéroïdes 48 h

5.6. Sensibilité aux agents chimiothérapeutiques

La sensibilité au Cisplatine (figure 26) et au Taxol (figure 27), deux agents chimiothérapeutiques utilisés lors du traitement du cancer ovarien, ainsi qu'au TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) (figure 28), une molécules thérapeutique, ont été évaluée pour les deux lignées cellulaires OVC-116-A et COV-2. La concentration d'agent chimiothérapeutique occasionnant 50% de mortalité cellulaire (IC_{50}) a été évalué pour chaque lignée cellulaire. Les résultats sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 10

Sensibilité (IC_{50}) aux agents chimiothérapeutiques*

	Cisplatine (μM)	Taxol (μM)	TRAIL (ng/ml)
OVC-116-A	6	0,2	100
COV-2	8	10	Résistante**

* : Les valeurs de ce tableau proviennent des courbes de sensibilité moyenne de 3 essais indépendants et en triplicata

** : Le terme *résistante* réfère au fait que la lignée cellulaire ne semble pas être affectée par l'agent thérapeutique

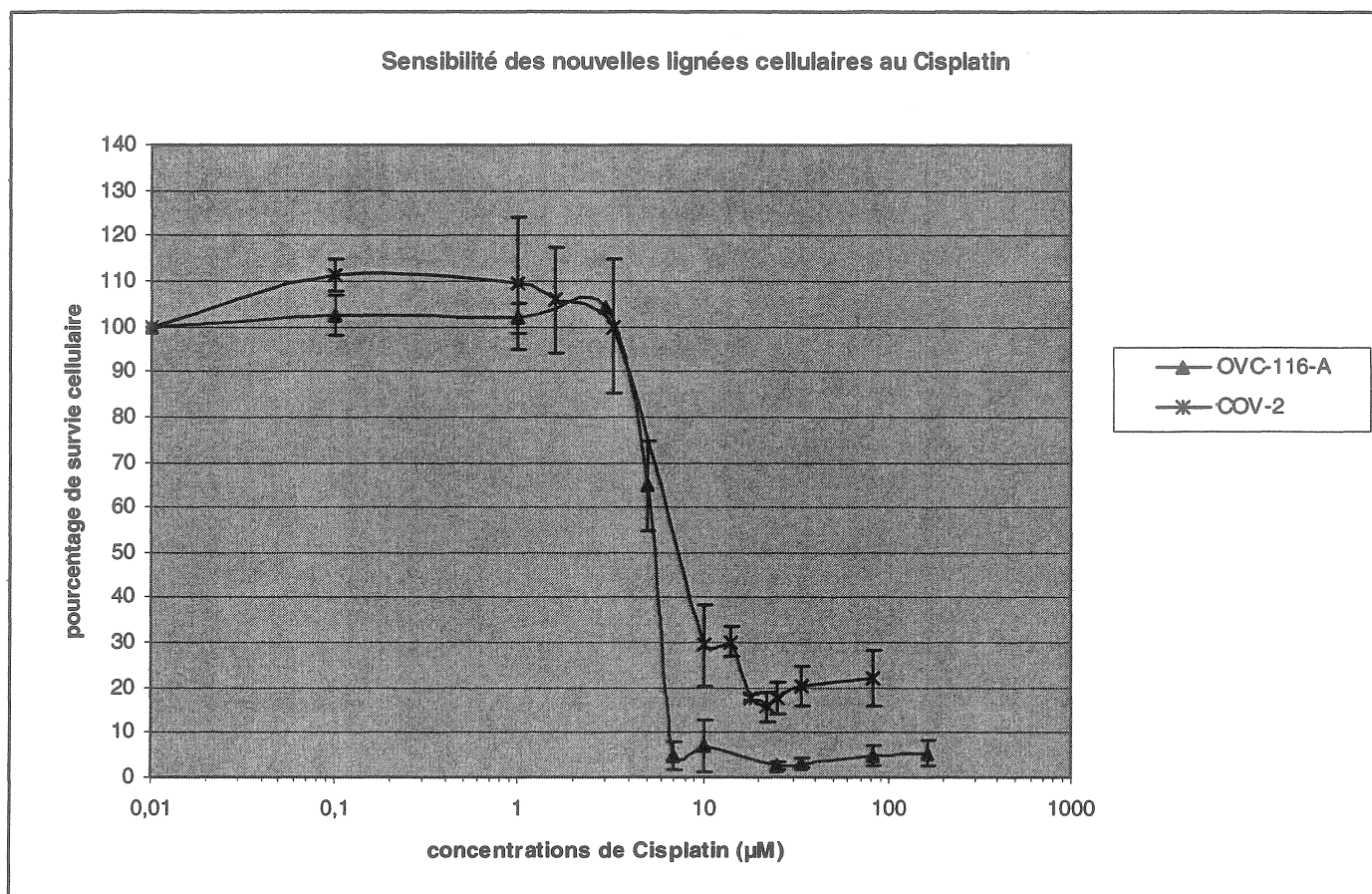


Figure 26 : Sensibilité des nouvelles lignées au Cisplatine.

La sensibilité au Cisplatine a été évaluée pour les deux nouvelles lignées cellulaires. La lignée OVC-116-A a un IC_{50} évalué à $6 \mu\text{M}$ tandis que la lignée cellulaire COV-2 a un IC_{50} évalué à $8 \mu\text{M}$. De plus, cette lignée cellulaire montre un taux de survie minimal d'environ 20% et ce, même en utilisant de fortes concentrations d'agent chimiothérapeutique. Au niveau de la sensibilité au Taxol (figure 27), La lignée OVC-116-A a un IC_{50} évalué à $0,2 \mu\text{M}$. Pour la lignée COV-2, celle-ci semble montrer une plus grande résistance à cet agent chimiothérapeutique en ayant un IC_{50} cinquante fois plus élevées que celui de OVC-116-A, soit $10 \mu\text{M}$.

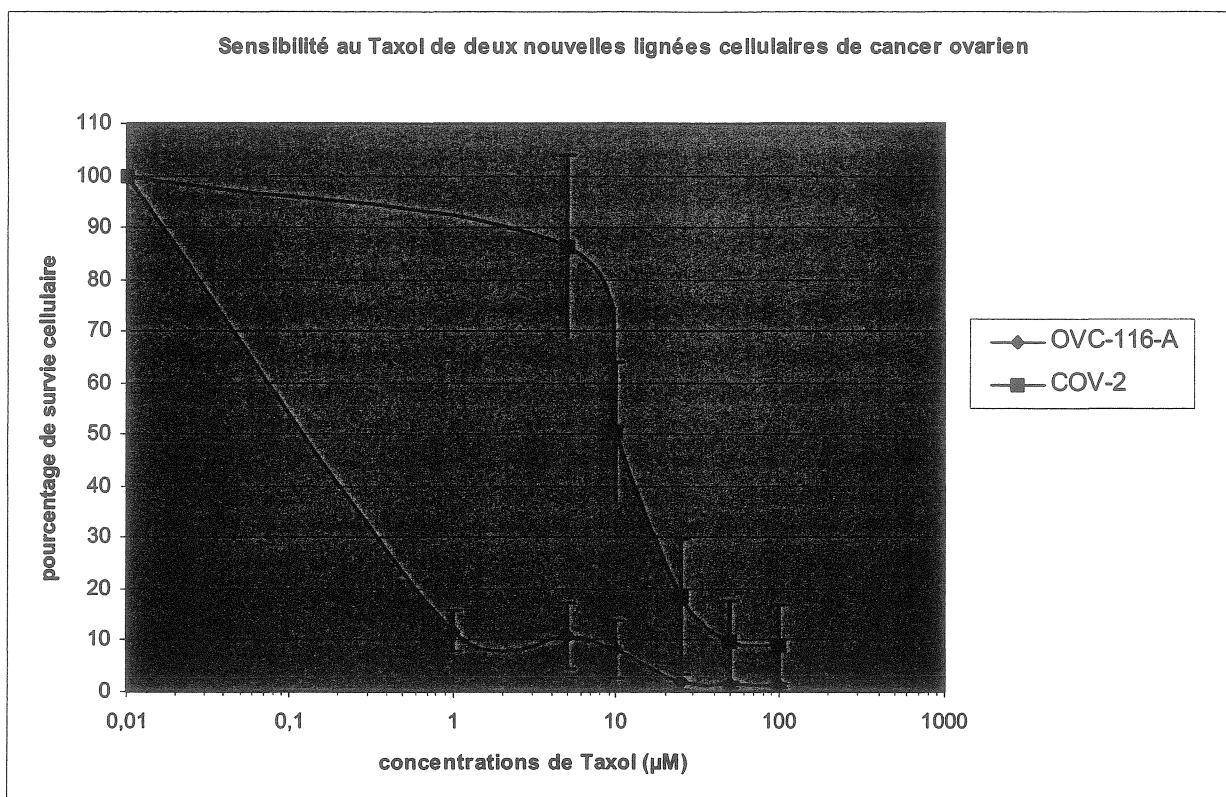


Figure 27 : Sensibilité des nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien au Taxol

TRAIL (figure 28) est une molécule de la famille du $\text{TNF-}\alpha$ dont on y associe un certain potentiel en tant que molécule thérapeutique (LANE et al., 2004). La lignée cellulaire OVC-116-A montre une grande sensibilité à cet agent même en utilisant des concentrations de TRAIL aussi faible que 100 ng/ml. Pour ce qui a trait à la lignée COV-2, c'est le phénomène inverse qui est observé. Celle-ci semble être totalement résistante à l'apoptose induite par le TRAIL.

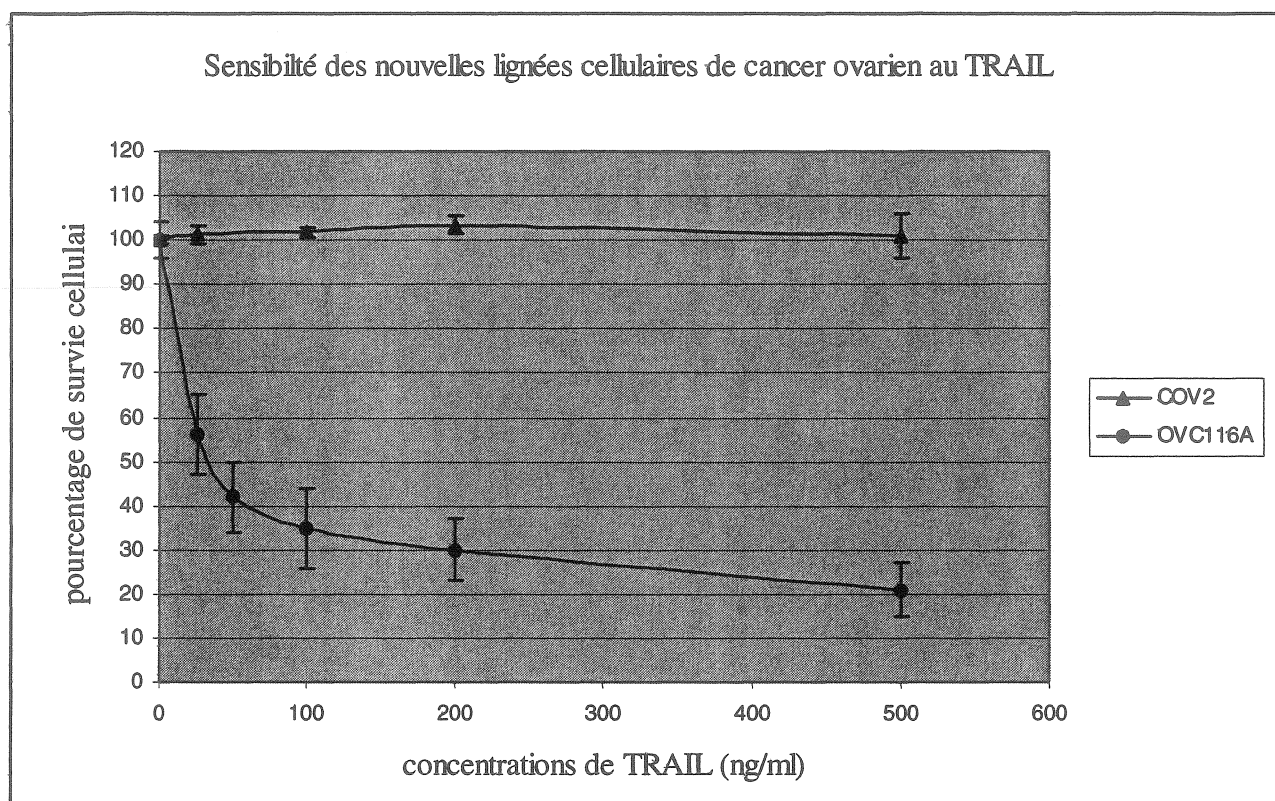


Figure 28 : Sensibilité des nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien au TRAIL

5.7. Essais de tumorigénicité *in vivo*

La capacité des nouveaux modèles de cancer ovarien à croître *in vivo* a été évaluée d'une part par des injections sous-cutanées de cellules cancéreuses dans des souris NUDE et dans des souris SCID et par la suite par des injections intrapéritonéales de cellules cancéreuses dans des souris SCID. Le résumé des tests *in vivo* est décrit dans le tableau 11.

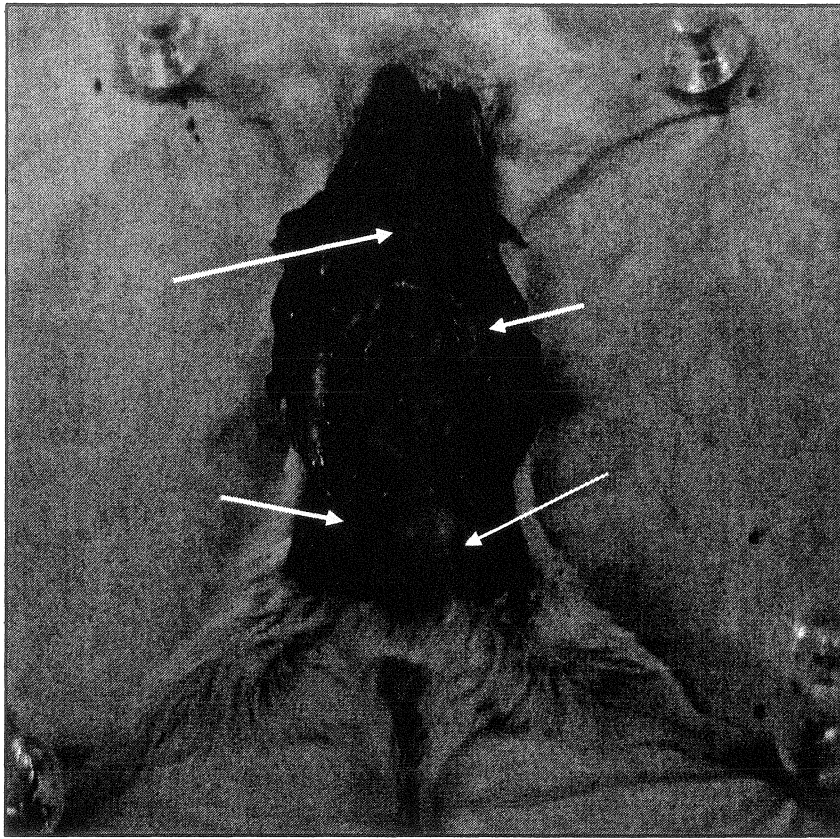
Tableau 11

Essais de tumorigénèse in vivo

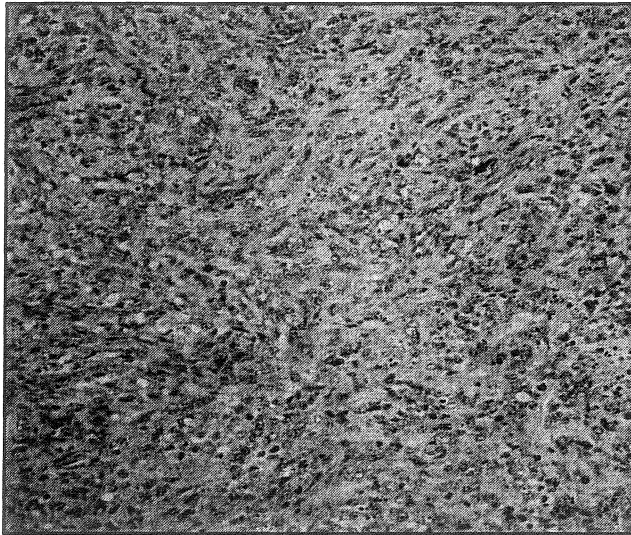
	<u>Sous-cutanées</u> <u>Souris NUDE</u> <u>10 millions cell \ inj</u>	<u>Sous-cutanées</u> <u>Souris SCID</u> <u>10 millions cell \ inj</u>	<u>Intra péritonéale</u> <u>Souris SCID</u> <u>16 millions cell \ inj</u>
OVC-116-A	12 \ 12* (d = 10 mm) <u>Durée: 14 jours</u>	12 \ 12 (d = 10 mm) <u>Durée: 14 jours</u>	7 \ 7 Env. 1,5 ml ascite <u>Durée: 21 jours</u>
COV-2	0 \ 12 <u>Durée: 43 jours</u>	8 \ 8 (d = 5 mm) <u>Durée: 43 jours</u>	6 \ 7 Peu ou pas d'ascite <u>Durée: 115 jours</u>

* indique le nombre de tumeur formée par injection

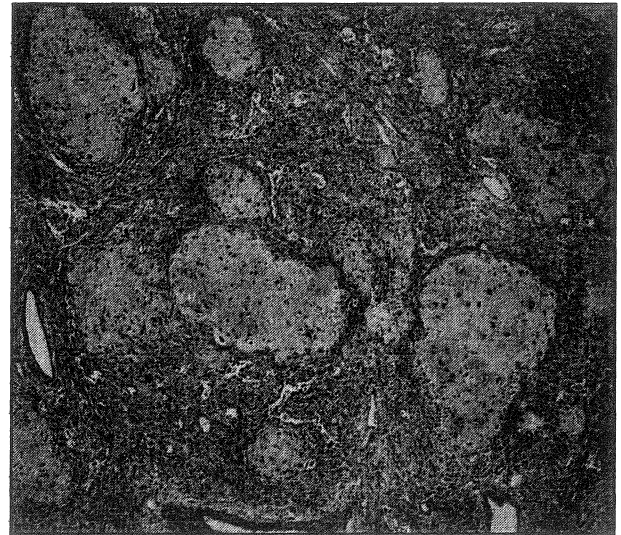
La lignée OVC-116-A est un modèle qui croît très rapidement *in vivo*. L'injection de cette lignée cellulaire dans les souris a montré la formation de tumeurs cancéreuses en dedans de 14 jours pour les injections sous-cutanées et lorsqu'injectée de façon intrapéritonéale, la mortalité moyenne des souris a été évaluée à 21 jours. L'autopsie des souris décédées suite aux injections intrapéritonéales de la lignée OVC-116-A montre la présence d'une tumeur principale au niveau pelvien, d'une adhésion foie-estomac-rate ainsi que plusieurs tumeurs secondaires au niveau du foie et du diaphragme (figure 29-A). La lignée cellulaire génère un volume d'ascite moyen de 1,5 ml par souris. L'analyse histologique des tumeurs excisées montrent que le type histologique des ces tumeurs est associé à une tumeur mullérienne maligne mixte de type homologue (figure 29-B). Le type histologique de la tumeur primaire (figure 29-C) de la patiente a donc été conservée.



A)



B)



C)

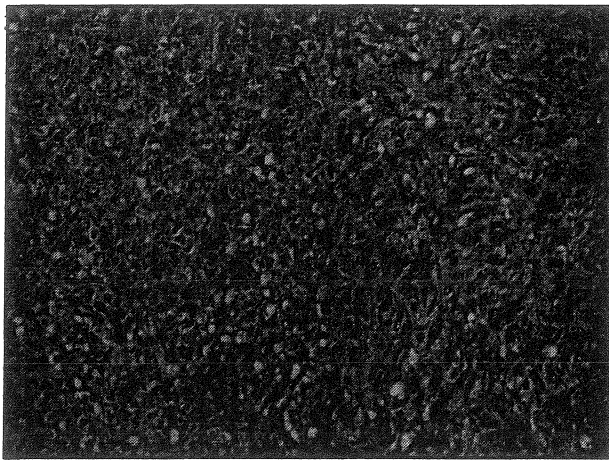
Figure 29 : Injection intrapéritonéale de la lignée OVC-116-A. Fig. 29-A) Distribution des tumeurs dans les souris SCID. Fig. 29-B) Coupe histologique et coloration H&E d'une tumeur OVC-116-A excisée Fig. 29-C) Coupe histologique et coloration H&E de la tumeur primaire de la patiente OVC-116-A

La lignée cellulaire COV-2 a aussi été injectée dans les animaux de façon sous-cutanée dans les souris NUDE et dans les souris SCID et, de façon intéressante, cette lignée cellulaire n'a montré aucune croissance tumorale dans les souris NUDE mais la présence de tumeurs cancéreuses ont pu être observées lorsqu'injectée dans des souris *scid*. Le temps de formation de tumeurs sous-cutanées est cependant environ trois fois plus long que pour la lignée OVC-116-A (43 jours pour COV-2 versus 14 jours pour OVC-116-A). Lorsqu'injectée de façon intrapéritonéale, la lignée COV-2 montre une croissance tumorale très lente. La mortalité moyenne des souris SCID injectées de façon intrapéritonéale est de 115 jours. L'autopsie des souris décédées suite à l'injection de la lignée COV-2 montre la présence de tumeur pelvienne, d'adhésion foie-estomac-rate-intestin ainsi que d'implants métastatiques au niveau du diaphragme augmentant l'épaisseur de celui-ci (figure 30-A). La lignée cellulaire forme très peu d'ascite in vivo. L'analyse histologique des tumeurs excisées de COV-2 démontre que la lignée cellulaire est de type séreux et que la lignée cellulaire montre un degré de différenciation frôlant l'anaplasie (figure 30-B); cependant, le type histologique est le même que celui du tissu primaire de la patiente COV-2 (figure 30-C).

Une tumeur issue de l'injection sous-cutanée, de l'injection intrapéritonéale ainsi qu'issus de la formation d'ascite a été remise en culture afin d'établir des sous-lignées cellulaire de OVC-116-A et de COV-2. L'analyse in vitro de ces sous-lignées n'a montré aucune différence significative avec les lignées parentales.



A



B



C

Figure 30 : Injection intrapéritonéale de COV-2. Fig. 30-A) Distribution des tumeurs dans les souris *scid.*, Fig. 30-B) Coupe histologique et coloration H&E d'une tumeur COV-2, Fig. 30-C) Coupe histologique et coloration H&E de la tumeur primaire de la patiente COV-2.

6. Discussion

Le cancer des ovaires est une des causes majeures de mortalité chez la femme en Amérique du Nord. C'est le cancer gynécologique le plus létal. L'hétérogénéité à même la maladie rend difficile l'étude de ce cancer. Dans ce mémoire, deux nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien ont été établies à partir d'échantillons biologiques provenant de l'ascite de patientes atteintes de cancer ovarien. Ces nouvelles lignées cellulaires ont été caractérisées selon plusieurs paramètres. La morphologie de ces lignées a été étudiée en microscopie à contraste de phase ainsi qu'en microscopie électronique à balayage. En microscopie en contraste de phase, les deux lignées cellulaires ont montré une morphologie épithéliale caractérisée principalement par l'apparence cuboïde des cellules. La caractérisation microscopique de ces lignées cellulaires montre plusieurs spécialisations de surface comme des microvillosités, des lamellipodes ainsi que la présence de sacs zéiotiques. Il est connu que la présence de microvillosités est en fonction de la nutrition cellulaire. Plus la cellule acquiert des nutriments, plus le nombre de microvillosités à la surface de la cellule augmentent. Aussi, à l'extrémité de chaque microvillosité, il y a une plus grande concentration de récepteurs de facteurs de croissance (KESSEL, 1974). La présence de lamellipodes à surface cellulaire est aussi décrite comme un phénomène associé à la pinocytose. Une grande densité de lamellipodes sur la surface des cellules en culture indique que celles-ci acquièrent un grand nombre de métabolites (KESSEL, 1974). De plus, il semble que la présence de lamellipodes soit aussi en fonction du cycle cellulaire. Une plus grande formation de lamellipodes est habituellement observée lorsque les cellules sont en phase G_1 -S du cycle cellulaire (KESSEL, 1974). La présence de cette structure dans les deux nouvelles lignées cellulaires de cancer ovarien est peut-être liée au fait que les lignées cancéreuses sont en prolifération active et donc, souvent en phase G_1 -S. De plus, les lamellipodes sont une des nombreuses caractéristiques des cellules cancéreuses. La présence de sacs zéiotiques (appelé

aussi excérence bulbeux ou exocyte) est une spécialisation de surface qu'on ne retrouve que sur la lignée COV-2. Ces sacs sont caractérisés comme étant des structures bulbeuses ou sphériques souvent observées lorsque les cellules sont en phase M ou au début de la phase G₁ du cycle cellulaire. La présence exagérée de sacs zéiotiques à la surface des cellules transformées ou cancéreuses semble être une caractéristique unique dont très peu de chose sont connues (KESSEL, 1974). Les deux lignées cellulaires ont aussi été caractérisées pour leurs propriétés de sécrétion de marqueurs diagnostique tels que CA125, l'antigène carcinoembryonique (ACE) et l'antigène de membrane épithéliale (MUC1). Ces analyses ont été faites par l'entremise du laboratoire de biochimie clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (campus Fleurimont). Par une analyse ELISA de type sandwich, les milieux de culture conditionnés de chaque lignée cellulaire ont été analysés et aucun n'a montré la présence de ces marqueurs. Il est connue dans la littérature que la sécrétion de CA125 ainsi que l'antigène de membrane épithéliale (MUC1) sont des caractéristiques associées aux cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire (AUERPERG et al., 2001). Par contre, d'autres types cellulaire,s comme les cellules mésothéliales, peuvent aussi sécréter du CA125 (AUERSPERG et al, 2001). Néanmoins, l'établissement de modèles cellulaires n'exprimant pas ces marqueurs s'avèrent un outil efficace pour étudier le rôle de ces protéines dans la tumorigénèse. Les deux nouveaux modèles de cancer ovarien ont aussi été caractérisés au niveau de l'expression de marqueurs cellulaires spécifiques. D'abord le statut de EGFR ainsi que ErbB2 ont été étudiés pour les deux lignées cellulaires. Il est bien établi dans littérature que des mutations ou la dérégulation des récepteurs de la famille EGFR est un événement important dans le processus de tumorigénèse du cancer ovarien (MAIHLE et al, 2002). Les deux nouvelles lignées de cancer ovarien expriment plus de EGFR et de ErbB2 à leur surface que les cellules normales et de façon plus spécifique, la lignée OVC-116-A exprime plus de ErbB2 que la lignée COV-2. Cette caractéristique rend donc la lignée OVC-116-A, un modèle intéressant pour des études sur l'implication de ErbB2 comme marqueur

pronostique pour la détection du cancer ovarien (HALDANE et al., 1990 ; CAMILLERI-BROET et al., 2004). Les lignées cellulaires ont aussi été caractérisées pour l'expression de protéines associées à l'adhésion intercellulaire comme la N-cadhérine, la E-cadhérine et la P-cadhérine. Les cadhérines sont des molécules importantes dans l'adhésion cellulaire. En conditions normales, les cellules normales de la surface épithéliale de l'ovaire n'expriment que la N-cadhérine. Cependant, lorsqu'elles se transforment pour devenir cancéreuses, celles-ci continuent à exprimer la N-cadhérine mais peut aussi exprimer la E-cadhérine et/ou la P-cadhérine (AUERSPERG et al, 2001). Dans les lignées cellulaires OVC-116-A et COV-2, la N-cadhérine est exprimée mais aucune P-cadhérine n'a été détectée. L'expression de la E-cadhérine a été détectée de façon très faible que dans la lignée COV-2. E-cadhérine est une protéine clé qui joue un rôle important dans l'adhésion intercellulaire spécifiquement celles des cellules épithéliales (FALEIRO-RODRIGUES et al., 2004). La perte de la protéine E-cadhérine mène à l'invasion et parfois à la prolifération (FALEIRO-RODRIGUES et al., 2004). L'expression de E-cadhérine semble, selon une étude, mener à l'induction de l'apoptose par l'inhibition de la voie de signalisation de survie PI3K/AKT (FREEDMAN et al, 2004). La lignée OVC-116-A semble représenter un bon modèle pour étudier l'implication de la protéine E-cadhérine dans le cancer ovarien car cette lignée présente certains phénotypes caractéristiques des cellules résistantes à l'apoptose tels que la résistance à l'anoïkose, une prolifération cellulaire rapide et de la dissémination rapide lorsqu'injectée in vivo et ceci tout en n'ayant pas d'expression de la E-cadhérine. Le statut des récepteurs d'oestrogènes a aussi été analysé dans les nouveaux modèles de cancer ovarien et aucun changement significatif a été observé. Par la technique d'immunofluorescence indirecte, la présence de MUC1, l'antigène humain de membrane épithéliale (Ber-Ep4) ainsi que les cytokératines 8 et 18, des marqueurs prouvant la provenance épithéliale des lignées cellulaires, ont été étudiés. La protéine MUC1, qui n'était pas sécrétée par la lignée OVC-116-A ni par la lignée COV-2, semble être exprimée dans les deux lignées

cellulaires mais de façon cytoplasmique. La localisation cytoplasmique de MUC1 semble être un phénomène répandu dans d'autres lignées cellulaires de cancer ovarien telles que CaOv-3, OVCAR-3, SKOV-3, PA-1, ES-2 et A2780 (STIMPFL et al., 1999). La présence de MUC1 cytoplasmique semble corrélér, selon certaines études, au phénomène de résistance des tumeurs de cancer ovarien aux drogues de chimiothérapie de la famille des platiniures (TAKANO et al., 2004). Cette protéine, lorsque surexprimée, est donc considérée comme un marqueur de mauvais pronostics pour les patientes atteintes de cancer ovarien. De plus, une étude récente effectuée dans la lignée cellulaire de cancer du sein ZR-75-1 semble démontrer que la portion cytoplasmique de MUC1 régule l'expression du facteur de transcription FOXO3A, un facteur de transcription impliqué dans la réparation de l'ADN suite à un stress oxydatif, induisant ainsi une certaine résistance à l'apoptose (YIN et al., 2004). Par immunofluorescence, l'antigène de membrane épithéliale Ber-Ep4 et les cytokératines 8 et 18 ont aussi été analysés et semblent être présents chez les deux lignées cellulaires. Ces résultats montrent que les deux lignées cellulaires sont bien d'origine épithéliale. Les analyses de marqueurs par sécrétion et par immunobuvardage de type Western n'ont montré aucune présence de la protéine CA125 dans les deux lignées cellulaires. Cette constatation a été observée à nouveau par immunofluorescence sur des cellules cancéreuses croissant en sphéroïde. La présence de CA125 est une caractéristique habituellement associée aux cellules épithéliales de cancer ovarien de type séreux. Il aurait été attendu d'observer la présence de cette protéine dans la lignée cellulaire COV-2 car il est possible de détecter la présence de CA125 dans les milieux de culture conditionnés par les cellules COV-2 à bas passage (résultats non présentés). Dans les lignées cellulaires, on ne peut pas attribuer l'absence de CA125 au fait que les patientes aient été traitées avec de la chimiothérapie car les échantillons proviennent d'une étape pré-chimiothérapie. Par contre, on ne peut pas négliger le fait que ces cellules ne croissent peut-être pas dans un milieu de culture favorisant une expression optimale de CA125. Cependant, on peut quand même émettre l'hypothèse que les lignées

cellulaires possèdent une mutation dans le gène de CA125 ou dans le mécanisme de glycosylation de la protéine pouvant affecter la liaison des anticorps monoclonaux aux épitopes antigéniques M11 ou OC125. Aussi, des expériences préliminaires de RT-PCR semi-quantitatifs ont montré la présence de CA125 dans la lignée cellulaire COV-2 lorsqu'en utilisant une sonde amplifiant la partie du gène de CA125 codant pour les répétitions en tandem de la protéine (résultats non présentés). Cependant, ces résultats restent encore à confirmer.

L'analyse moléculaire des mutations dans différents gènes d'intérêt a été effectuée pour les deux lignées cellulaires. Les gènes TP53, BRCA1, BRCA2 et KRAS ont été analysés. Comme 50% de tous les cancers ovariens, le gène TP53 est muté dans les lignées OVC-116-A et COV-2. Le gène TP53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers (SCHUIJER et BERNIS, 2003). La plupart des mutations dans le gène TP53 résultent en une stabilisation de la protéine p53. Normalement, p53 agit en supprimant la croissance cellulaire en contrôlant l'entrée en phase S du cycle cellulaire (SCHUIJER et BERNIS, 2003). Des mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2, du moins celles retrouvées le plus fréquemment dans la population canadienne française, ont aussi été recherchées dans les deux lignées cellulaires. Aucune de ces mutations a été détectée dans les lignées cellulaires. Habituellement, des mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 sont des mutations retrouvées dans les cancers d'origine familiale. Les résultats obtenus pour ce test suivent l'historique familial au niveau du cancer. Des mutations dans le gène KRAS ont aussi été recherchées et l'analyse moléculaire de ce gène a montré que la lignée OVC-116-A a une mutation dans ce gène au niveau du codon 13. Des mutations dans le codon 13 du gène KRAS sont des événements plutôt rares dans le cancer ovarien. Une mutation dans ce codon mène à un phénotype moins agressif qu'une mutation dans le codon 12 de ce gène. Cependant, une mutation dans le codon 13 du gène mène quand même à une augmentation des propriétés clonogéniques et de la croissance sans adhésion (GUERRERO et al., 2000). Des

caryotypes ont été faits pour chacune des nouvelles lignées cellulaires et des résultats intéressants ont pu être observés. Habituellement, les cancers ovariens présentent des caryotypes plutôt complexes caractérisés principalement par plusieurs trisomies, des tétrasomies et des translocations multiples sur une même chromosome (WANG et al, 2000). Cette observation a été retrouvée dans le caryotype de la lignée COV-2. Par contre, la lignée cellulaire OVC-116-A ne présente qu'une trisomie du chromosome 10 ainsi qu'une translocation entre le chromosome 6 et le chromosome 15. Ces aberrations chromosomales sont très rares et souvent non-associées au cancer ovarien. Il est reconnu que des trisomies au niveau des chromosome 5, 7 et 8 ainsi qu'une monosomie du chromosome X sont des événements considérés comme des altérations chromosomales primaires dans les cancers ovariens (WANG et al., 2000). Seulement sept autres cas de lignée cellulaire portant une trisomie 10 ont été répertoriés dans la littérature dont deux (OV38 et TOV21G) ont été établies au Québec (WANG et al., 2000). Avec ces deux autres lignées cellulaires établies au Québec, la lignée OVC-116-A pourrait constituer un bon modèle d'étude pour l'implication du chromosome 10 dans l'incidence du cancer ovarien au Québec. OVC-116-A a aussi une translocation entre le chromosome 6 et le chromosome 15. Ce type de translocation n'est pas répertorié dans la littérature et surtout non-associé au cancer ovarien.

Des paramètres de croissance ont aussi été évalués pour les deux lignées cellulaires. Les résultats obtenus lors de l'acquisition de ces données ont montré que les deux lignées cellulaires semblent croître de façon semblable car elles possèdent des pourcentages d'efficacité clonogénique en condition adhérente et non-adhérente ainsi que des temps de génération similaires. Leur capacité à croître et à survivre en sphéroïde a aussi été évaluée. Les deux nouvelles lignées cellulaires peuvent croître et généralement survivre en sphéroïde tel qu'observer par la double coloration à l'iodure de propidium et à l'orangé d'acridine. Cependant, on peut observer que certaines cellules se trouvant dans les sphéroïdes COV-2 semblent mourir à moyen terme tandis que celles

observées dans les sphéroïdes de la lignée OVC-116-A semblent être totalement viables. Par un test d'adhésion suite à une croissance en sphéroïde, il a été possible d'observer que les sphéroïdes COV-2 montraient une mortalité cellulaire après 72 heures de croissance sans adhésion tandis que l'effet contraire a été observé pour la lignée cellulaire OVC-116-A. Ces résultats semblent même indiquer que la lignée OVC-116-A a la capacité de pouvoir proliférer lorsque celle-ci croît en sphéroïde. D'autre test comme le test d'incorporation de l'iodure de propidium a permis de confirmer cette observation. L'induction de l'anoïkose a été évaluée pour les deux lignées cellulaires croissant en sphéroïdes. D'abord, par un test d'induction de l'anoïkose par un dosage XTT, il a été observé que la lignée OVC-116-A n'était pas affectée par l'anoïkose tandis que la lignée COV-2 montrait une mortalité cellulaire précoce (en dedans de 48 heures) mais que les cellules semblaient s'adapter lentement à cette situation. Cependant, le moyen utilisé pour doser la viabilité cellulaire, dosage XTT, comporte certaines limites comme le fait que celle-ci dose l'activité métabolique des cellules. Dans un sphéroïde, seulement les cellules qui constituent la face externe de la masse cellulaire sont actives, les autres couches cellulaires sous-jacentes sont moins actives métaboliquement compte tenu de la diminution de l'accessibilité des nutriments et de l'oxygène. Donc, on ne peut pas exclure que la diminution de la viabilité cellulaire observée dans la lignée COV-2 soit causée par une diminution de l'activité métabolique des cellules COV-2. De plus, comme pour les nutriments, l'accessibilité du XTT et de son substrat par les cellules pourrait être diminué par le fait que les cellules croissent en masse compacte. Un phénomène similaire est observé lors des traitements des tumeurs à l'aide d'agents chimiothérapeutiques et est une des causes du non fonctionnement du traitement. Donc, encore une fois, la diminution de la viabilité cellulaire dans la lignée COV-2 pourrait être aussi associée à ce phénomène. Afin de pouvoir confirmer les premiers résultats observés par le dosage XTT, un test ELISA dosant la mortalité cellulaire a été fait. Cet ELISA dose les histones associées à de l'ADN retrouvées dans le cytoplasme des cellules cancéreuses suite à l'induction de l'anoïkose ou de l'apoptose. Ces

complexes histone-ADN proviennent de la dégradation internucléosomale de l'ADN, un phénomène observé lors de l'induction de l'apoptose et de l'anoïkose. Ce test a permis de confirmer que les cellules OVC-116-A ne sont pas affectées par l'anoïkose lorsqu'elles sont en sphéroïdes et qu'une anoïkose massive est détectée dans la lignée COV-2 après seulement 24 heures d'incubation en suspension. Ce même résultat aurait pu être observé par un test de migration d'ADN (*DNA laddering*). Dans ce test, une population cellulaire présentant de l'anoïkose aurait été représentée par plusieurs bandes d'ADN lorsque l'on ferait migrer de l'ADN génomique provenant de ces cellules tandis qu'une population cellulaire vivante n'aurait présenté qu'une seule et unique grosse bande d'ADN génomique en haut du gel de migration. La résistance à l'anoïkose des cellules OVC-116-A en sphéroïde a aussi été confirmée de façon moléculaire par des immunobuvardages de type WESTERN contre des protéines effectrices de l'apoptose/anoïkose ainsi que pour des protéines homologues de la famille Bcl-2. Ces analyses ont montré que la pro-caspase 9 (un caspase initiatrice) et la pro-caspase 3 (une caspase effectrice) n'étaient pas clivées et donc, non activées ce qui confirmait le fait que ces cellules n'étaient pas en anoïkose. L'inactivité de la caspase 3 a été aussi observée via la présence de son substrat PARP qui n'est pas clivé lorsque les cellules OVC-116-A croissent en sphéroïde. Pour la lignée cellulaire COV-2, on remarque cependant que, malgré le fait que la caspase 9 n'est pas activée, l'on peut observer une disparition de la pro-caspase 3 (suggérant, une activation de la caspase) et supporté par le clivage de la protéine PARP. D'autres caspases initiatrices comme la caspase 2, la caspase 8 ou la caspase 10 pourraient activer la caspase 3 dans la lignée cellulaire COV-2. Cependant, si cette activation se fait via la caspase 10, cela implique que le fait de faire croître les cellules COV-2 en sphéroïde amène un stimulus externe à la cellule favorisant la mort cellulaire. Au niveau des protéines de la famille des homologues Bcl-2, on remarque que la lignée OVC-116-A montre une plus grande expression de Bcl-2 que COV-2. Certaines études dans d'autres systèmes cellulaires ont montré que la surexpression de Bcl-2 dans des cellules normales

immortalisées protégeaient ces cellules contre l'anoïkose (RAK et al., 1995). On peut émettre l'hypothèse que la résistance à l'anoïkose observée dans la lignée OVC-116-A pourrait être liée à la surexpression de Bcl-2 dans ces cellules. Ces observations quant à la sensibilité ou à la résistance à l'anoïkose des nouvelles lignées cellulaires pourraient expliquer en partie les résultats observés lorsque les cellules sont injectées de façon intrapéritonéale dans les souris SCID. Lors de ces injections, il avait été observé que la lignée OVC-116-A formait des tumeurs dans les animaux après un très court moment (21 jours en moyenne) tandis que la lignée COV-2 formaient des tumeurs dans les animaux de façon très tardive (115 jours en moyenne). Cela reflète bien le fait que l'anoïkose n'est pas induit dans les cellules OVC-116-A quand elles sont en suspension tandis que le contraire est observé pour les cellules COV-2 mais que celles-ci s'adaptent car des tumeurs sont observées dans les animaux.

Un autre aspect qui a été analysé dans les nouvelles lignées de cancer ovarien est leur sensibilité à des agents de chimiothérapie et à une autre molécule d'intérêt thérapeutique comme le TRAIL. Par un test XTT, l'IC₅₀ des lignées cellulaires a été évalué pour le Cisplatine et pour le Taxol. Pour leur sensibilité au Cisplatine, les deux lignées cellulaires ont montré des IC₅₀ se situant entre 6 et 8 μ M. Ces deux lignées peuvent être considérées comme très résistantes à cet agent car ces valeurs sont presque cent fois supérieures à celle évalué pour la lignée cellulaire OVCAR-3 (BEAUDIN, et al, 2005) une lignée cellulaire provenant d'une patiente qui ne répondait plus au Cisplatine. Un point intéressant à noter est le fait que la lignée COV-2, en plus d'avoir la plus haute valeur d'IC₅₀, semble posséder un minimum de viabilité de 20% quelque soit la dose d'agent utilisée. Ce qui fait considérer cette lignée comme une très résistante à cet agent. Cette résistance est aussi très visible lors du traitement avec différentes doses de Taxol car la lignée COV-2 a une IC₅₀ évaluée à 10 μ M, une concentration très toxique normalement. La lignée OVC-116-A a montré une IC₅₀ cinquante fois plus faible (0,2 μ M). Le TRAIL est une molécule de la famille du TNF-

α qui semble avoir un intérêt thérapeutique dans le traitement du cancer ovarien. Des études pré-cliniques utilisant du TRAIL pour le traitement du cancer ovarien ont démontré que celui-ci avait un potentiel antitumorale (LANE et al., 2004). Les deux lignées cellulaires ont été exposées à différentes concentrations de TRAIL pendant 96 heures et un dosage XTT a été effectué. Les résultats ont montré que la lignée COV-2 semble être totalement résistante à l'apoptose induite par le TRAIL tandis que la lignée OVC-116-A montre l'effet contraire, c'est-à-dire une mortalité de la population cellulaire en n'utilisant que de très petites doses de TRAIL. La lignée cellulaire COV-2 représente donc un modèle de choix pour étudier les mécanismes de la résistance à la chimiothérapie car cette lignée semble être résistante à au moins trois agents chimiothérapeutiques.

Finalement, les deux lignées cellulaires ont été injectées de façon sous-cutanée dans des souris NUDE et des souris SCID. La lignée OVC-116-A a montré une croissance très rapide dans les deux types de souris tandis que la lignée COV-2 SCID et les souris NUDE se situe au niveau de la présence de certaines cellules immunitaires. Dans les souris SCID, aucune cellule du système immunitaire est présente car ces souris sont complètement immunodéficientes. Les souris NUDE (développées à partir du transfert du gène NUDE (*nuBR*) dans des souris CD-1) sont des souris immunodéficientes aussi mais qui contiennent quand même des cellules NK (*Natural Killer*). On peut émettre l'hypothèse que l'injection des cellules COV-2 dans les souris NUDE n'a pas permis la formation de tumeur par la faute de la présence de cellules NK et qu'étant donné que dans les souris SCID, aucune de ces cellules n'est présente, des tumeurs sous-cutanées ont pu croître. Si cette hypothèse s'avère vraie, cela implique qu'à la surface des cellules COV-2, il y a une molécule antigénique qui provoque la reconnaissance de ces cellules par les cellules NK et qui empêche les cellules cancéreuses de former des tumeurs. Il est connu que les cellules NK peuvent reconnaître des cellules cibles de deux différentes. La première façon

consiste en la reconnaissance d'anormalités cellulaires comme la réduction de la densité de molécules CMH de classe 1 à la surface des cellules ou la présence de molécules normalement non-exprimées à la surface des cellules saines. La deuxième façon est par la présence d'une spécialisation de surface anormale sur la cellule tumorale. Dans tous les cas, la reconnaissance d'une cellule par une cellule NK résulte en la lyse de la cellule ciblée.

Les deux nouveaux modèles de cancer ovarien ont aussi été injectés de façon intrapéritonéale dans les souris SCID et comme discuté précédemment, la lignée OVC-116-A s'est disséminée et a formé des tumeurs secondaires très rapidement dans les souris tandis que la lignée COV-2 a montré le phénomène contraire. Cependant, dans tous les cas, la distribution des tumeurs secondaires est représentative des cancers ovariens de haut grade chez la femme. Donc, pour ce type d'expérience, les lignées OVC-116-A et COV-2 peuvent être considérées comme d'excellents modèles d'études de cancer ovarien in vivo. Un fait intéressant à noter est que lorsqu'on excise une tumeur formée par la lignée OVC-116-A, on remarque que l'histologie de la tumeur est caractérisée par la présence d'une composante carcinomateuse et d'une composante sarcomateuse seulement. Donc, cela implique que lors des passages cellulaires in vitro, une sélection des cellules s'est effectuée et a permis la perte de la composante cartilagineuse initialement présente dans la tumeur primaire de la patiente.

7. Conclusions

Le cancer ovarien est le cancer gynécologique le plus létal. Au Canada en 2004, il a été estimé que le taux de mortalité pour ce cancer est de 66%. La difficulté de dépister la maladie de façon précoce ainsi que l'absence de symptômes spécifiques rendent difficile le diagnostic des patientes. Les nouvelles découvertes sur ce cancer arrivent souvent au compte-goutte car cette maladie montre une grande hétérogénéité à l'intérieur d'une même tumeur et que très peu de modèles cellulaires et animaux sont accessibles aux chercheurs. Dans ce mémoire, deux nouveaux modèles de cancer ovarien, OVC-116-A et COV-2, ont été établis et caractérisés. Ces nouvelles lignées cellulaires ont été caractérisées au niveau de leurs paramètres de croissance, de leur clonogénicité, de leur tumorigénèse *in vivo* ainsi que pour l'expression de plusieurs marqueurs cellulaires. De plus, certaines analyses de mutations ont été effectuées sur gènes les gènes TP53, BRCA1, BRCA2 et KRAS. Des caryotypes spectraux ont aussi été effectués sur les deux lignées cellulaires. La lignée cellulaire OVC-116-A a été montrée pour être un bon modèle de résistance à l'anoïkose car celle-ci n'a montré aucune mort cellulaire par des techniques qualitatives, semi-quantitatives et par des méthodes quantitatives. De plus, lorsque ces cellules sont maintenues en suspension, celles-ci semblent proliférer. Aussi, l'analyse de certaines protéines impliquées dans les processus d'anoïkose ont été analysées dans les sphéroïdes de OVC-116-A. Ces analyses ont montré que cette lignée cellulaire, lorsqu'elle croît en sphéroïde, ne montre aucune activation des pro-caspases 9 et 3 et une plus grande expression de la protéine Bcl-2, une protéine qui est nécessaire dans la survie en suspension des cellules. Le modèle cellulaire COV-2, quant à lui, semble être un excellent modèle pour des études sur la chimiorésistance car cette lignée montre une grande résistance au Cisplatine, au Taxol ainsi qu'au TRAIL, une molécule dont un certain effet antitumoral est associé.

8. Perspectives

Évidemment, la caractérisation des lignées OVC-116-A et de COV-2 est un travail toujours en constante évolution. Certaines analyses de caractérisation restent encore à effectuer. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer la présence ou l'absence de télomérase activée dans les deux lignées cellulaires parce qu'il est connu que la présence d'une télomérase active est une des trois caractéristiques de base des cellules cancéreuses. Donc, il serait intéressant de savoir si les deux nouvelles lignées cellulaires ont cette caractéristique. De plus, d'autres techniques pourraient être utilisées afin de pouvoir détecter la présence ou l'absence de la protéine CA125 à la surface des deux modèles cellulaires parce que certaines études tendent à démontrer que la présence ou l'absence de CA125 membranaire peut moduler certains paramètres tels que la prolifération, la motilité, l'invasion, la capacité d'invasion et la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques des cellules de cancer ovarien (BAUDIN et al., 2004). Enfin, la sensibilité aux différents agents chimiothérapeutiques pourraient être fait sur les cellules croissant en sphéroïdes. De cette façon les valeurs obtenues seraient beaucoup plus représentatives de la condition pathologique humaine que lorsque le test se fait sur des cellules croissant en monocouche. Finalement, afin de compléter la validation de la lignée OVC-116-A comme modèle résistance à l'anoïkose, plusieurs expériences majeures doivent être effectuées. De façon prioritaire, les expériences présentées doivent être reproduites afin de valider les résultats obtenus jusqu'à ce jour. Ensuite, la formation de sphéroïde pourrait être inhiber à l'aide de méthylcellulose afin de pouvoir garder les cellules en suspension de façon isolées et y doser l'induction de l'anoïkose sur ces cellules. L'importance de Bcl-2 ou de Bcl-X_L dans la survie cellulaire en suspension pourrait être étudiée en créant des populations stables de OVC-116-A n'exprimant plus de Bcl-2 ou de Bcl-X_L et y doser l'induction de l'anoïkose dans ces populations. L'expérience contraire pourrait être faite dans la lignée cellulaire COV-2 pour vérifier si la

surexpression de ces protéines permet d'augmenter la résistance à l'anoïkose. Enfin, les deux types de populations pourraient être injectés de façon intrapéritonéale dans des souris SCID et y vérifier la vitesse de formation de tumeur secondaire.

9. Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma famille et mes ami(e)s de m'avoir encouragée et accompagnée tout le long de mes études. Eux comme moi savent tous les sacrifices que j'ai fait pour me rendre là où je suis. Lorsque j'ai commencé ma maîtrise, c'était très clair pour moi que ce n'était qu'un raccourci qui me permettrait d'obtenir plus rapidement un emploi dans le monde de la représentation pharmaceutique. Ce que j'ai appris, au cours de ma maîtrise, c'est que la recherche sur le cancer est un domaine très exaltant et rempli de défis qui me permet de pouvoir me surpasser à tous les jours. C'est grisant de penser que chaque petite découverte peut avoir un impact majeur sur la survie des gens atteints de cette terrible maladie. Pour m'avoir fait découvrir ce merveilleux domaine, je tiens à remercier le Dre Claudine Rancourt. Je la remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné toute la latitude voulue pour faire de ce projet de recherche, un projet à mon image. J'aimerais aussi remercier le Dr Alain Piché pour avoir eu une vision externe et de m'avoir montré mon projet sous des angles différents. Ses conseils ont souvent été utiles afin de voir mon projet de recherche avec une autre perspective. L'apprentissage d'une profession ne se fait pas tout seul, il y a des gens qui sont là pour répondre à nos questions et pour nous aider. En ce sens, j'aimerais remercier Denis Lane, assistant de recherche, Vicky Blouin, technicienne de laboratoire et surtout Carole Bergeron, une technicienne de recherche qui m'a appris énormément de techniques qui m'ont été utiles tout au long de ma maîtrise. Si je pense être devenue un professionnel polyvalent, c'est un peu grâce à elle et surtout grâce à ce qu'elle m'a appris. Finalement, je veux remercier « ma petite famille de Sherbrooke », Philippe Bernier-Dodier, Marianne Boivin, Annik Albert, Maxime Pinard, Martine Migneault, les étudiants du laboratoire du Dr Antonio Conconi (Michel Paquette, Maxime Tremblay et Geneviève Levasseur) ainsi que plusieurs stagiaires d'avoir vécu ces deux années magnifiques avec moi.

10. Références

- Anh, H.J., Kim, T.S., Han, S.M., Shin, J.W., Yang, H.O., 2004, **Mechanism of Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells**, J. Cell. Biochem. 91: 1043-1052
- Auersperg, N. W., Alice S.T.; Choi, Kyung-Chul; Kang, Sung Keun; Leung, Peter C.K., 2001, **Ovarian surface epithelium: Biology, Endocrinology and Pathology**: Endocrine review 22: 255-288
- Bamberger, E.S., Perrett, CW., 2002, **Angiogenesis in epithelial ovarian cancer**, J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol., 55: 348-359
- Bank, Harvey L.; 1988, **Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide**; In Vitro Cellular & Developmental Biology 24, April 1988 (4) : 266-273
- Bar J.K, Harlozinska A.; **Morphological and phenotypical characterization of a new established ovarian carcinoma cell line (OvBH-1)**. Anticancer Research 2000, 20:2975-2980
- Bast, R.C., Klug, T.L, St-John, E., Jenison, E., Niloff, J.M., Lazarus, H., Berkowitz, R.S., Leavitt, T., Griffiths, C.T., Parker, L., Zurawski, V.R., Knapp, R.C., 1983, **A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer**, N-E Journ. Med., 309(15): 883-887

Bates, R.C., Edwards, N.S., Yates, J.D., 2000, **Spheroids and cell survival**, Critical Rev, Oncol./Hematol. 36: 61-74

Bayani J, Brenton JD, Macgregor PF, Beheshti B, Albert M, Nallainathan D, Karaskova J, Rosen B, Murphy J, Laframboise S, Zanke B, Squire JA., 2002 **Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and expression microarrays**. Cancer Res. Jun 15;62(12):3466-76

Beaudin, J., Pinard, M., Boivin, M., Mignault, M., Piché, A. Rancourt, C., 2005, **Inhibition of CA125 expression at the cell surface suppress tumor growth**, (soumis)

Bible, K.C., Boerner, S.A., Kirkland, K., Anderl, K.L., Bartelt Jr., D., Svingen, P.A., Kottke, T.J., Lee, Y.K., Eckdahl, S., Stalboerger, P.G., Jenkins, R.B., Kaufmann, S.H., 2000, **characterization of an ovarian carcinoma cell line resistant to cisplatin and flavopiridol**, Clinical Cancer Res., 6, February: 661-670

Boulikas, T., Vougiouka, M., 2003, **Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review)**, Oncology Reports 10: 1663-1682

Brown, M.R., Masiero, L., Kohn, E.C., 2000, **Tumor angiogenesis and metastasis**, Principles and practice of gynecologic oncology, 3^{ième} édition, Édition Lippincott Williams & Wilkins, Chapitre 4 , pages 87-101

Burleson, K.M., Casey, R.C., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema Jr, T.R., Skubitz, A.P.N, 2004, **Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix componentes and mesothelial cell monolayers**, Gynecol. Oncol. 93: 170-181

Camilleri-Broet S, Hardy-Bessard AC, Le Tourneau A, Paraiso D, Levrel O, Leduc B, Bain S, Orfeuvre H, Audouin J, Pujade-Lauraine E; 2004, **HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group** Ann Oncol. Jan;15(1):104-12

Campiglio, M., S. Ali et al. 1999, **Characteristics of EGFR family-mediated HRG signals in human ovarian cancer**: J Cell Biochem, 73(4): 522-532

Carraway, K.L., V.P. Ramsauer, B. Haq, C.A Carothers Carraway, 2002, **Cell signaling through membrane mucins**: BioEssays 25: 66-71

Casey, R.C, Burleson, K.M, Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema Jr, T.R., Ruff, L.E., Skubitz, A.P.N, 2001, **β 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids**, Am. J. Pathol. 159 (6) December 2001: 2071-2080

Cavallaro, U., Schaffhauser, B., Christofori, G., 2002, **Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch ?**, Cancer Letters 176: 123-128

Conover, C.A., Hartmann, L.C., Bradley, S., Stalboerger, P., Klee, G.C., Kalli, K.R., Jenkins, R.B., 1998, **Biological characterization of human epithelial ovarian carcinoma cells in primary culture: the insulin-like growth factor system**, Exp. Cell Res. 238: 439-449

Cuatrecasas, M., N. Erill, E. Musulen, I. Costa, X. Matias-Guiu, and J. Prat, 1998, **K-ras mutations in nonmucinous ovarian epithelial tumors: a molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients**: Cancer 82:1088-95.

Darimont, C., Avanti, O., Tromvowski, Y., Vautravers-Leone, P., Kurihara, N., Roodman G.D., Colgin, L.M., Teullberg-Reinert, H., Pfeifer, A.M.A., Offord, E.A., Mace, K., 2002, **SV40 T antigen and telomerase are required to obtain immortalized human bone cells without loss of differentiated phenotype**, Cell Growth & Diff. , 13, February 2002 : 59-67

Dorr, R.T., Von Hoff, D.D., 1994, **Cancer chemotherapy handbook**, 2^{ème} edition, Edition Appleton and Lange, USA

Erba, E., Berganashi, D., Bassano, L., Ronzoni, S., Di Liberti, G., Muradore, I., Vignati, S., Faircloth, G., Jimeno, J., D'Incalci, M., 2000, **Isolation and characterization of an IGROV-1 human ovarian cancer cell line made resistant to Ecteinascidin-743 (ET-743)**, Br. J. Cancer 82 (10): 1732-1739

Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Ferreira VM, Lopes CS; **Association of E-cadherin and beta-catenin immunoexpression with clinicopathologic features in primary ovarian carcinomas**; Hum Pathol. 2004 Jun;35(6):663-9.

Fathalla, MF., 1971, **Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia?**: Lancet 2:163

Freedman RS, Deavers M, Liu J, Wang E, 2004, **Peritoneal Inflammation-A Microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC)**; J Transl Med. Jun 25;2(1):23

Fukazawa, H., Mizuno S., Uehara, Y., 1995, **A microplate assay for quantitation of anchorage-independent growth of transformed cells**, *Annal Biochem*, Jun 10, 228 (1): 83-90

Gaetje, R., Winnekendonk, D.W., Arh, A., Kaufmann, M., 2002, **Ovarian cancer antigen CA125 influences adhesion of human and mammalian cell lines in vitro**, *Clin. Exp. Obst. & Gyn.* XXIX, 1: 34-36

Gaetje, R., Winnekenonk, D., Scharl, A., Kaufmann, M., 1999, **Ovarian cancer antigen CA125 enhances the invasiveness of the endometriotic cell line EEC 145**, *J. Soc. Gynecol. Investi.* 6(5) Sept/Oct: 278-281

Grégoire, L., Rabah, R., Schmelz, E-M., Munkarah, A., Roberts, P.C., Lancaster, W.D., 2001, **Spontaneous malignant transformation of human ovarian surface epithelial cell *in vitro***, *Clin. Cancer Res.* 7, December 2001: 4280-4287

Guerrero, S., I. Casanova, L. Farre, A. Mazo, G. Capella, and R. Mangués, 2000, **K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression**: *Cancer Res.* 60: 6750-6.

Haldane JS, Hird V, Hughes CM, Gullick WJ, 1990, **c-erbB-2 oncogene expression in ovarian cancer**; *J Pathol.* Nov;162(3):231-7

Hamilton T.C., Young, R.C., McCoy, W.M., Grotzinger, K.R., Green, J.A., Chu, E.W., Whang-Peng, J., Rogan, A.M., Green, W.R., Ozols, R.F., 1983, **Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptor**, Cancer Res. 43 (11): 5379-5389

Hamilton, G., 1998, **Multicellular spheroids as an in vitro tumor model**, Cancer Letters 131: 29-34

Hogdall, E. V., C. K. Hogdall, J. Blaakaer, L. Christensen, J. E. Bock, J. Vuust, E. Glud, and S. K. Kjaer, 2003, **K-ras alterations in Danish ovarian tumour patients. From the Danish "Malova" Ovarian Cancer study**: Gynecol Oncol. 89: 31-6

Hoglund, M., D. Gisselsson, G. B. Hansen, T. Sall, and F. Mitelman, 2003, **Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution**: Cancer Res 63:3378-85.

Institut national du cancer du Canada, **Statistiques canadiennes sur le cancer 2004**, Toronto, Canada, 2004

Jazaeri, A.A, C.J. Yee, C. Sotiriou, K.R. Brantley, J. Boyd, E.T. Liu, 2002, **Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers**: Journal of the National Cancer Institute 94 (13) July 3: 990-1000

Kaufmann, S.H., Vaux, D.L., 2003, **Alteration in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance**, Oncogene 22: 7414-7430

Kessel, R. G. a. C. Y. S. 1974. **Scanning Electron Microscopy in Biology**. Edition Springer-Verlag, New-York.

Kmet, LM., Cook, LS., Magliocco, AM., 2003, **A review of p53 expression and mutation in human bening, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumor**, Cancer Res., Jan. 15, 97 (2): 389-404

Ko, L.J., C. Prives, 1996, **p53: puzzle and paradime**: Genes & Development 10: 1054-1072

Konishi, I., Fendrick, J.L., Parmley, T.H., Quirk, J.G., O'Brian, T.J., 1994, **Epidermal growth factor enhances secretion of the ovarian tumor-associated cancer antigen CA125 from the human amnion WISH cell line**, J. Soc. Gynecol. Invest., 1(1) Jan.-Mar.: 89-96

Lane, D., Cartier, A., L'Espérance, S., Côté, M., Rancourt, C., Piché, A., 2004, **Differential induction of apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human ovarian carcinoma cells**, Gynecol. Oncol. 93(3): 594-604

Langdon, S.P., Lawrie, S.S., Hay, F.G., Hawkes, M.M., McDonald, A., Hayward, I.P., Schol, D.J., Hilgers, J., Leonard, R.C.F., Smyth, J.F., 1998, **Charaterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines**, Cancer Res. 48, November 1: 6166-6172

Lécuru, F., Guilbaud, N., Agostini, A., Augereau, A., Vilde, F., Taurelle, R., 2001, **Description of two new human ovarian carcinoma models in nude rats suitable for laparoscopic experimentation**, Surg. Endosc, 15: 1346-1352

Liu, J., Yang, G., Thompson-Lanza, J.A., Glassman, A., Hayes, K., Patterson, A., Marquez, R.T., Auersperg, N., Yu, Y., Hahn W.C., Mills, G.C., Bast Jr., R.C. 2004, **A genetically defined model for human ovarian cancer**, Cancer Res., March 1; 64: 1655-1663

Lodish, H., Berk, A., Zipurski, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 1999, **Molecular cell biology**, 4^{ième} édition, édition W.H. Freeman and company, USA

Maihle NJ, Baron AT, Barrette BA, Boardman CH, Christensen TA, Cora EM, Faupel-Badger JM, Greenwood T, Juneja SC, Lafky JM, Lee H, Reiter JL, Podratz KC, 2002 **EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer**, Cancer Treat Res. 2002;107:247-58

Makhija, S., Taylor D.D., Gibb, R.K., Gercel-Taylor, C., 1999, **Taxol-induced Bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids**, Int. J. Oncol. 14: 515-521

Marth, C., Fuith, L.C., Bock, G., Daxenbichler, G., Dapunt, O., 1989, **Modulation of ovarian carcinoma tumor marker CA-125 by γ -interferon**, Cancer Research, 49, December 1: 6538-6542

Marth, C., Zeimet, A.G., Widschwendter, M., Daxenbichler, G., 1998, **Regulation of CA125 expression in cultured human carcinoma cells**, Internat. J. Biol. Markers, 13(4): 207-209

Mc Neil, C., 1998, **Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer**, JNCI, Jun 17, 90 (12): 882-883

McCoy, ML., Mueller, CR., Roskelly, CD., 2003, **The role of the breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) in sporadic epithelial ovarian cancer**, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, Oct 7, 1 (1): 72

Milde-Langosh, K., Reithdorf, S., 2003, **Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer**, *J. Cell. Physiol*, 196 (2): 224-244

Möbus, V., Gerharz, C.D., Press, U., Moll, R., Beck, T., Mellin, W., Pollow, K., Knapstein, P.G., Kreienberg, R., 1992, **Morphological, immunohistochemical and biochemical characterisization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines**, *Int. J. Cancer* 52: 76-84

Möbus, V., Gerharz, C.D., Weikel, W., Merk, O., Dreher, L., Kreienber, R., Moll, R., 2001, **Characterization of human carcinosarcoma cell line if the ovary established after *in vivo* change of histologic differentiation**, *Gynecol. Oncol.* 83: 523-532

Mueller-Klieser, W., 1997, **Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications**, *Am. J. Physiol.* 273 (Cell Physiol. 42): C1109-C1123

Murdoch, W. J. M., Anna C., 2002, **Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis**: *Reproduction* 123:743-750.

Nadeau G., Boufared, N., Moisan, A., Lemieux, KM., Cayanan C., Monteiro, AN., Gaudreau, L., 2000, **BRCA1 can stimulate gene transcription by a unique mechanism**, EMBO Rep., Sept., 1 (3): 260-265

Netter, F., 1997, **Atlas of human anatomy**: East Hanover, New Jersey, Novartis, 525 p.

Nitta, M., Katabuchi, H., Ohtake, H., Tashiro, H., Masaru, Y., Okamura, H., 2001, **Characterization and tumorigenicity of human ovarian surface epithelial cells immortalized by SV40 large T antigen**, Gynecol. Oncol. 81: 10-17

Okamura H, Katabuchi, H., 2003, **Detailed morphology of human ovarian surface epithelium focusing on its metaplastic and neoplastic capability**, It. J. Anat. Embryol. 106 (2) supplement 2: 263-276

Orr, G.A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., Band Horwitz, S., 2003, **Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules**, Oncogene 22: 7280-7295

Ozols, R. F., 2003, **Ovarian cancer**: Hamilton, London, BC Decker Inc., 246 p.

Poels, L.G., Jap, P-H.K., Rameakers, F.F.C.S., Scheres, J.M.J.C., Thomas, C.M.G., Vooijs, P.G., Croes, H.J.E., Mungyer, G., 1989, **Characterization of a hormone-producing ovarian carcinoma cell line**, Gynecol. Oncol., 32: 203-214

Prewett, M., Rockwell, P., Rockwell, RF., Giorgio, NA., Mendelsohn, J., Scher, HR., Goldstein, NI., **The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma**, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 1996, Nov, 19 (6): 419-427

Provencher, D.M., Lounis, H., Champoux, L., Tetrault, M., Manderson, E.N., Wang, J.C., Eydoux, P., Savoie, R., Tonin, P.N., Mes-Masson, A-M., 2000, **Characterixation of four novel epithelial ovarian cancer cell lines**, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal 36, June 2000: 357-361

Rak J, Mitsuhashi Y, Erdos V, Huang SN, Filmus J, Kerbel RS. 1995, **Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression**. J Cell Biol. Dec;131(6 Pt 1):1587-98

Robinson, E.E, Zazzali, K.M., Corbett, S.A., Foty, R.A., 2003, **$\alpha 5 \beta 1$ integrin mediates strong tissue cohesion**, J. Cell Sci. 116: 337-386

Saldanha, S.N., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O., 2003, **Analysis of telomerase activity and detection of its catalytic subunit hTERT**, Analytical Biochem. 315: 1-21

Santini, M.T., Rainaldi, G., Indovina, P.L., 2000, **Apoptosis, cell adhesion and extracellular matrix in three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids**, Critical Rev, Oncol./Hematol. 36: 75-87

Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. **Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes** . Science, 1996; 273: 494-7

Shen, X., Kramer, R.H., 2004, **Adhesion-mediated sqamous cell carcinoma survival through ligand-independant activation of epidermal growth factor**, Am. J. Pathol. 165 (4), October 2004 : 1315-1329

Sonoda, T., Kobayashi, H., Kaku, T., Hirakawa, T., Nakano, H., 2003, **Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell line**, Cancer Letters 196: 229-237

Stimpfl M, Schmid BC, Schiebel I, Tong D, Leodolter S, Obermair A, Zeillinger R., 1999, **Expression of mucins and cytokeratins in ovarian cancer cell lines**, Cancer Letters. Oct 18;145(1-2):133-41

Takano M, Fujii K, Kita T, Kikuchi Y, Uchida K, 2004, **Amplicon profiling reveals cytoplasmic overexpression of MUC1 protein as an indicator of resistance to platinum-based chemotherapy in patients with ovarian cancer**. Oncol Rep. Dec;12(6):1177-82

Thompson, D. et al., 2002, **Evaluation of linkage of breast cancer to putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from Breast Cancer Linkage consortium**: PNAS, January 22, 99(2): 827-831

Tonin, P.N, Perret, C., Lambert, J.A., Paradis, A-J., Kantemiroff, T., Benoit, M-H., Martin, G., Foulkes, W.D., Ghadirani, P., 2001, **Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in early-onset french canadian breast cancer cases unselected for family history**: Int. J. Cancer 95: 189-193

Tonin, P.N., Mes-Masson, A-M., Futreal, P.A., Morgan, K., Mahon, M., Foulkes, W.D., Cole, D.E.C., Provencher, D., Ghadirani, P., Narod, S.A., 1998, **Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in french canadian breast and ovarian cancer families**: Am. J. Hum. Genet. 63:1341-1351

Tortora GJ, S. R. G., Parent, J-C, 1993, **Principes d'anatomie et de physiologie, nouvelle édition**: Montréal, CEC collégial et universitaire, pages 999-1017

Tsao, S.W., Wong, N., Wang, X., Liu, Y., Kong Wan, T.S., Fung, L.F., Lancaster, W.D., Gregoire, L., Wong, Y.C., 2001, **Nonrandom chromosomal imbalances in human ovarian surface epithelial cells immortalized by HPV16-E6E7, viral oncogenes**, Cancer Gen. And Cytogen., 13: 141-149

Vanderhyden, BC., Shaw, TJ., Ethier, J-F., 2003, **Animals models of ovarian cancer**, Reproductive Biology and Endocrinology, 1: 67-77

Vershaegen C.F., Hu, W., Du, Y., Mendoza, J., Early, J., Deavers, M., Freedman, R.S., Bast, R.C., Kudelka, A.P., Kavanagh, J.J., Giovanella, B.C., 2003, **Establishment and characterization of cancer cell cultures and xenograft derived from primary or metastatic mullerian cancers**, Clinical Cancer Res. 9, February 2003: 845-852

Wang J, Mes-Masson AM, Tonin PN, Provencher D, Eydoux P; **Trisomy of chromosome 10 in two cases of ovarian carcinoma**; Cancer Genet Cytogenet. 2000 Apr 1;118(1):65-8

Whitehouse, C. and Solomon, E., 2003, **Current status of molecular characterization of ovarian cancer antigen CA125 and implications for its use in clinical screening**, Gynecol. Oncol., 88, S152-S157

Wilson, A.P., Dent, M., Pejovic, T., Hubbard, T., Radford, H., 1996, **Characterization of seven human ovarian tumour cell lines**, Br. J. Cancer 74: 722-727

Witton, C.J., J.R. Reeves et al. 2003, **Expression of the HER 1 – 4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer**: J Pathol, 3: 290-7

Wong, A.S.T., Maines-Bandiera, S.L., Rosen, B., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Leung, P.C.K., Rosekelley, C.D. and Auersperg, N., 1999, **Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history**, Int. J. Cancer 81: 180-188

Woods, L.K., Morgan, R.T., Quinn, L.A., Moore, G.E., Semple, T.U., Stedman, K.E., 1979, **Comparison of four new cell lines from patients with adenocarcinoma of the ovary**, Cancer Res., 39, November 1979: 4449-4459

Yin L, Huang L, Kufe D., 2004, **MUC1 oncoprotein activates the FOXO3a transcription factor in a survival response to oxidative stress**. J Biol Chem. Oct 29;279(44):45721-7

Yuan, Y., Kim, W-H., Han, H.S., Lee, J-H., Park, H-S., Chung, J-K, Kang, S-B., Park, J-G.,
1997, **Establishment and characterization of human ovarian carcinoma cell lines**,
Gynecol. Oncol., 66: 378-387